

# Estandarización de la técnica de PCR anidada para la detección de las translocaciones *TCF3/PBX1* y *KMT2A/AFF1* en pacientes con leucemia linfoide aguda remitidos a la Unidad de Diagnóstico Molecular de la Fundación Jacinto Convit

Standardization of the nested PCR technique for the detection of *TCF3/PBX1* and *KMT2A/AFF1* translocations in patients with acute lymphoid leukemia referred to Unidad de Diagnóstico Molecular of Fundación Jacinto Convit

Thais Rivodó<sup>1a</sup>, Juan M. Núñez<sup>2c</sup>, Betania V. Rodríguez<sup>3a</sup>, Maria A. Duarte<sup>4a</sup>, Antonietta Porco<sup>5d</sup>, Daniela A. Escobar<sup>6a</sup>, Ana F. Convit<sup>7a,b\*</sup>

## RESUMEN

*La presencia de translocaciones cromosómicas en la leucemia linfóide aguda (LLA) incide en la biología de la enfermedad y predice la respuesta clínica de los pacientes. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) anidada —una de las variantes más específicas y sensibles de la PCR— es posible detectar hasta una célula mutada en una población de 10<sup>6</sup> células sanas de las translocaciones cromosómicas más frecuentes: t(1;19) y t(4;11). La sensibilidad y eficacia de esta técnica depende fundamentalmente*

*del diseño de los cebadores utilizados en la reacción. Por ello, la Unidad de Diagnóstico Molecular de la Fundación Jacinto Convit (UDM-FJC) llevó a cabo la estandarización de la PCR anidada y evaluación de cebadores descritos previamente en la literatura para la detección de las mutaciones más comunes en pacientes con LLA, con el fin de validar y confirmar la especificidad de los cebadores empleados en el diagnóstico realizado en esta Unidad. Los productos evaluados para cada variante estudiada fueron secuenciados mediante el método de Sanger y analizados utilizando herramientas bioinformáticas (PCR virtual, MegaX y BLASTN). Nuestros resultados evidencian altos porcentajes de identidad y cobertura para las mutaciones *TCF3/PBX1* y *KMT2A/AFF1*. Las secuencias obtenidas fueron publicadas en GenBank. Los resultados confirman la especificidad y eficiencia de los cebadores, siendo adecuados para el diagnóstico*

DOI: <https://doi.org/10.47307/GMC.2024.132.1.11>

<sup>1</sup>Licenciada en Biología, Mención Biología Celular, <sup>2</sup>Licenciado en Biología, Mención Biología Celular, <sup>3</sup>Licenciada en Bioanálisis, <sup>4</sup>PhD en Ciencias, Mención Inmunología, <sup>5</sup>PhD en Ciencias, Mención Biología Molecular, <sup>6</sup>Licenciada en Ciencias Biológicas, <sup>7</sup>Magíster en Gerencia Pública.

Recibido: 20 de octubre 2023  
Aceptado: 10 de febrero 2024

<sup>a</sup>Unidad de Diagnóstico Molecular, Fundación Jacinto Convit. Caracas, Venezuela, <sup>b</sup>Jacinto Convit World Organization, Inc., California, EUA, <sup>c</sup>Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela, <sup>d</sup>Laboratorio de Genética Molecular Humana, Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela. E-mail: \*publicaciones@jacintoconvit.org

molecular en pacientes con LLA en la UDM-FJC, y una posible referencia para otros laboratorios de diagnóstico.

**Palabras clave:** Leucemias, transcritos de fusión, leucemia linfoblástica aguda, RT-PCR anidada, secuenciación Sanger, TCF3/PBX1 y KMT2A/AFF1.

## SUMMARY

*The presence of chromosomal translocations in acute lymphoid leukemia (ALL) contributes to the disease's biology and predicts patients' clinical response. Through the nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique, one of the most sensitive variants of PCR, it is possible to detect up to a single mutated cell in a population of  $10^6$  healthy cells of the most frequent chromosomal translocations in patients with ALL: t(1;19) and t(4;11). The sensitivity and efficacy of this technique depend fundamentally on the design of the primers used in the reaction. For this reason, the Unidad de Diagnóstico Molecular of Fundación Jacinto Convit (UDM-FJC) carried out the nested PCR standardization and evaluation of primers previously described in the literature for the detection of the most common mutations in patients with ALL to validate and confirm the specificity of the primers used in the diagnosis provided by this unit. The products evaluated for each of the studied variants were sequenced using the Sanger method and analyzed with bioinformatic tools (virtual PCR, MegaX, and BLASTN). Our results showed high percentages of identity and coverage for the TCF3/PBX1 and KMT2A/AFF1 mutations. Additionally, the achieved sequences were published in GenBank. The results confirm the specificity and efficiency of the primers, being suitable for the molecular diagnosis of patients with ALL at UDM-FJC and a possible reference to other diagnostic laboratories.*

**Keywords:** Leukemia, fusion transcripts, acute lymphoblastic leukemia, nested RT-PCR, Sanger sequencing, TCF3/PBX1, and KMT2A/AFF1.

## INTRODUCCIÓN

La leucemia linfocítica aguda (LLA) es una patología que resulta de la transformación y proliferación maligna de células progenitoras linfocíticas en la médula ósea, sangre y sitios extramedulares. El riesgo de desarrollar LLA es

mayor en la población pediátrica y corresponde a aproximadamente el 80 % de los casos (1,2).

En Venezuela, de acuerdo con el último reporte publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2020, se estimaron 1 317 nuevos casos de leucemia en la población general, con más de 996 fallecidos (3). No obstante, la estadística no discrimina por tipos de leucemia, por lo que se desconoce la incidencia de LLA en la población venezolana.

Las translocaciones cromosómicas asociadas a LLA inciden en la génesis de la enfermedad, las cuales adicionalmente, pueden ser empleadas como marcadores moleculares que brindan información pronóstica que permite estratificar por riesgo a los pacientes y orientar su tratamiento inicial (4).

La OMS clasificó la leucemia linfocítica aguda precursora de células B (LLA-B) como: LLA-B con anomalías genéticas recurrentes y LLA-B sin otra especificación. Las anomalías genéticas recurrentes incluyen t(1;19) *TCF3-PBX1*, t(4;11) *KMT2A/AFF1* y t(9;22) *BCR-ABL1*.

La t(1;19) *TCF3/PBX1* tiene una prevalencia que varía entre el 3 % y 5 % en pacientes pediátricos y 3 % en adultos con LLA pre-B, y permite predecir una posible recaída de tipo aislada que afecte al sistema nervioso central (SNC). Dentro de las conductas clínicas más frecuentes en pacientes positivos para esta mutación, se encuentra la afectación de los denominados "sitios santuarios", siendo los más reportados, testículo y SNC. En los casos de recaída aislada ocurre la afectación particular y específica del SNC; es decir, únicamente se evidencian blastos en líquido cefalorraquídeo (demostrado por un citospin) sin presencia de blastos en médula ósea, testículos o sangre; en cuyo caso se habla de recaída completa o general. Sin embargo, debido a los nuevos protocolos terapéuticos, la t(1;19) *TCF3/PBX1* está asociada con un buen pronóstico (5-8). La t(4;11) *KMT2A/AFF1* es una causa común de LLA más agresiva, con una prevalencia que varía entre 10 %-20 % en bebés, 2 % en niños y 7 % en adultos, y se considera una translocación de mal pronóstico, ya que los pacientes presentan altas probabilidades de recaídas (9-11). Con respecto a la t(9;22) *BCR/ABL1* o cromosoma Filadelfia (Ph), se ha detectado hasta en un 5 %

de los pacientes pediátricos con leucemia y en el 15 %-20 % de LLA-B en adultos. La t(9;22) *BCR/ABL1* está asociada a una enfermedad más agresiva, aunque con la introducción de inhibidores específicos de la tirosina quinasa *BCR/ABL1*, como STI-571 (mesilato de imatinib), ha mejorado drásticamente el pronóstico de los pacientes con LLA Ph-positivo (1,12).

El uso de una combinación de técnicas moleculares sensibles y específicas como la RT-PCR, permite detectar de manera eficaz y rápida las mutaciones más comunes en pacientes con LLA, particularmente cuando es RT-PCR anidada (de dos rondas), cuya sensibilidad detecta una célula positiva dentro de un rango de  $10^5$ - $10^7$  células normales (12). Esta técnica es una variación de la PCR estándar que mejora la especificidad y el rendimiento de la reacción, en la que el producto de la primera ronda de amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda ronda con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada. El par de cebadores internos solo hibridará la translocación cromosómica de interés, aportando información esencial de valor clínico diagnóstico, pronóstico, predicción de respuesta al tratamiento y progresión de la enfermedad en pacientes con LLA (9,13-17).

El éxito de la RT-PCR anidada se logra con el apropiado diseño de los dos pares de cebadores sobre la secuencia de los genes involucrados en cada translocación.

Por tal razón, es fundamental el correcto diseño y uso de los cebadores, ya que se pueden generar productos inespecíficos y formar estructuras secundarias o dímeros que disminuyen la eficiencia de la reacción (9), lo que puede afectar significativamente el resultado del diagnóstico de un paciente.

Para garantizar un resultado fiable es necesario validar los cebadores que se utilizan en la prueba. La validación de los cebadores se puede realizar a través de herramientas bioinformáticas y la evaluación experimental en el laboratorio, a partir de la verificación de los productos obtenidos por RT-PCR anidada (18-21). Esto último se logra mediante la determinación del tamaño de los fragmentos, a través de electroforesis en geles de agarosa y secuenciación de los mismos. Las secuencias obtenidas son comparadas con el

Genbank, la base de datos de secuencias genéticas del National Institutes of Health (NIH) de Estados Unidos de América (EUA), una colección de disponibilidad pública de secuencias de ADN que permitirá evaluar el porcentaje de identidad y cobertura, así como la identificación de genes y variantes (22).

Por lo anteriormente expuesto, la UDM-FJC —que brinda un servicio de diagnóstico molecular gratuito a la población oncológica más vulnerable que acude a hospitales públicos del territorio nacional en convenio con la Fundación— se propuso llevar a cabo la estandarización de la técnica de PCR anidada, como método de diagnóstico molecular de las translocaciones más frecuentes descritas en pacientes con LLA y la validación de los cebadores previamente descritos en la literatura (9), para ser empleados en la detección de las mutaciones *TCF3/PBX1* y *KMT2A/AFF1* en pacientes con LLA. Cabe destacar, que la estandarización de la técnica de PCR anidada para la detección de la translocación *BCR/ABL1* fue realizada previamente en la UDM-FJC (23).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Muestras

#### Muestras biológicas

Se utilizó ADNc obtenido previamente mediante transcripción reversa (RT, por sus siglas en inglés) a partir del ARN aislado de muestras de médula ósea de dos pacientes, uno adulto y uno pediátrico, y en los que previamente se detectó la presencia de las translocaciones a evaluar mediante citometría de flujo, la cual fue realizada en un laboratorio externo por cada uno de los pacientes seleccionados para este estudio. Estas muestras se procesaron en la UDM-FJC, procedentes de dos centros con los cuales la FJC ha suscrito convenio, como el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes y el Hospital de Niños “J.M. de los Ríos”. Las muestras fueron obtenidas previo consentimiento informado, cada uno firmado respectivamente, por el paciente y el representante (en el caso del menor de edad), con la autorización para la realización del diagnóstico del panel LLA (*TCF3/PBX1*, *KMT2A/AFF1* y

*BCR/ABL1*) y estudios de investigación a partir de tales muestras. Dicho consentimiento informado cuenta con el aval del comité de bioética de cada hospital. El presente estudio guarda relación directa con la condición clínica que motivó la extracción original de la muestra.

### Líneas celulares

Se realizó extracción de ARN y síntesis de ADNc proveniente de las líneas celulares RS4 y 697, las cuales son positivas para las translocaciones *KMT2A/AFF1* y *TCF3/PBX1*, respectivamente. Estas líneas celulares fueron donadas por el St. Jude Children's Research Hospital de EUA.

### 2. PCR virtual

En el Cuadro 1, se muestran las secuencias de los cebadores empleados en la UDM-FJC, previamente notificados en la literatura (9). El sitio de hibridación de estos cebadores fue evaluado *in silico* mediante una PCR virtual con el software Sequence Extractor (24), usando secuencias de referencia reportadas en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) como molde (Cuadro 2).

### 3. Extracción del ARN

La extracción del material genético se realizó mediante el uso del reactivo TRIZOL®. Cada

Cuadro 1. Secuencias de los cebadores empleados para la amplificación por RT-PCR anidada del gen *GAPDH* y de las translocaciones *KMT2A/AFF1* y *TCF3/PBX1*

Gen y translocación*	Ronda de PCR	Secuencia 5'→3'
<i>GAPDH</i> <sup>(25)</sup>		CATCAAGAAGGTGGTGAA GGTCTTACTCCTTGGAG
<i>KMT2A/AFF1</i> <sup>(9)</sup>	1era ronda	CCGCCTCAGCCACCTAC TGTCAGTGAAGGTCG
	2da ronda	AGGACCGCAAGAAAAGA CGTTCCTTGCTGAGAATTTG
<i>TCF3/PBX1</i> <sup>(9)</sup>	1era ronda	CACCAGCCTCATGCACAAC TCGCAGGAGATTCATCACG
	2da ronda	CACCCTCCCTGACCTGTCT GGCCTGCTCGTATTTCTCC

Cuadro 2. Secuencias empleadas como molde para la PCR virtual

Alteración cromosómica	Gen	Número de acceso GenBank*	Fecha de publicación
t(1;9)	<i>TCF3</i>	NM_003200.5	22 oct 2022
	<i>PBX1</i>	NM_002585.4	27 nov 2022
t(4;11)	<i>KMT2A</i>	NM_001197104.2	09 dic 2022
	<i>AFF1</i>	NM_001166693.2	11 oct 2020

\* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

una de las muestras en estudio (1 mL de volumen inicial) fue diluida en buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) 1X en una proporción 1:1. Luego la dilución fue colocada en medio de gradiente de densidad, permitiendo el aislamiento de células mononucleares por acción de la centrifugación a 1 800 rpm (290 g) durante 30 minutos. El anillo de glóbulos blancos obtenido fue inmediatamente aislado y centrifugado en frío (4 °C) a 9 000 rpm (7 245 g) durante 5 minutos; luego de lo cual se añadió el reactivo TRIZOL® (en una proporción de 1 mL para una población de  $10^7$  células), se homogenizó levemente por pipeteo y se incubó en frío (-80 °C) durante un mínimo de 2 horas, con la finalidad de inactivar las proteínas e inhibir las nucleasas, permitiendo la separación de las muestras en dos fases, una fase orgánica donde queda solubilizado el ADN, y una fase acuosa donde se encuentra contenido el ARN de interés. Posteriormente se agregó cloroformo a la mezcla (proporción 1:2). Dicha mezcla fue centrifugada en frío (4 °C) a 12 000 rpm (12 879 g) durante 5 minutos, tras lo cual se recuperó la fase acuosa y se combinó con isopropanol en una proporción 1:1. Esta mezcla fue incubada a 25 °C durante 10 minutos e inmediatamente centrifugada a 12 000 rpm (12 879 g) durante 15 minutos. El sedimento recuperado luego de la centrifugación fue lavado con solución de etanol al 70 % y centrifugado a 12 000 rpm (12 879 g) durante 5 minutos. El sedimento obtenido fue incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos; posteriormente fue solubilizado en agua libre de ARNasas e incubado a 56 °C durante 15 minutos. Todas las muestras de ARN aisladas en el presente estudio fueron criopreservadas a -80 °C hasta su uso.

#### 4. Síntesis de ADNc

A partir de las muestras de ARN aisladas, se realizó la síntesis de ADNc de cada una de ellas. Durante la primera etapa de este protocolo, se llevó a cabo la reacción de pre-síntesis de ADNc, mezclando 200 ng de ARNm con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Random Primer (Promega) en 3  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas (IBI). Las muestras preparadas fueron incubadas a 65 °C durante 5 minutos; posteriormente, fueron colocadas en bloque de enfriamiento, realizándose a continuación la adición de los siguientes reactivos, hasta

completar un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ : buffer de reacción (250 nM Tris-HCl [pH 8,3], 375 mM KCl, 15  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  [50 mM DTT], RNAsin [1U/ $\mu\text{L}$ ], enzima M-MLV RT [10U] y dNTPs [2 mM]) (Promega). Las muestras fueron llevadas al termociclador y la RT fue programada bajo el siguiente esquema: 25 °C de hibridación durante 5 minutos, seguido de una fase de polimerización a 42 °C por 60 minutos y una extensión final a 70 °C durante 5 minutos.

#### 5. Reacción de PCR anidada y visualización de productos

La calidad del ADNc obtenido se confirmó amplificando por PCR el gen constitutivo *GAPDH*, con los cebadores *GAPDH* “Up/Down” descritos en el Cuadro 1. Para ello, se prepararon las mezclas de reacción de PCR en un volumen de 11,2  $\mu\text{L}$  de agua, para un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ : buffer de reacción 5X ([Cf]= 1X),  $\text{MgCl}_2$  (1,5 mM), dNTPs (150  $\mu\text{M}$ ), cebadores de *GAPDH* “Up/Down” (0,25  $\mu\text{M}$ ), enzima Taq Pol G2 Flexi (1U) (Promega) y 200 ng de ADNc. Las muestras fueron incubadas en el termociclador durante 5 minutos a 95 °C. Posteriormente, se realizaron 35 ciclos de amplificación programados a 95 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos; y se realizó una ronda de extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

La reacción se realizó en un termociclador de triple bloque (Applied Biosystems), y los productos de amplificación fueron revelados por electroforesis en geles de agarosa al 2,5 % teñidos con SYBR™ Safe DNA Gel stain, visualizados con el equipo Axygen® Gel Documentation System y fotodocumentados con Axygen Imaging.

La PCR para la amplificación de cada transcrito de fusión se realizó por separado para cada mutación analizada en este estudio. Las reacciones fueron llevadas a cabo siguiendo las condiciones descritas a continuación: 95 °C durante 30 segundos, seguido de 35 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 60 segundos y 72 °C por 60 segundos, terminando con una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Los cebadores empleados para la amplificación de los genes de fusión *KMT2A/AFF1* y *TCF3/PBX1*, se encuentran descritos en el Cuadro 1.

La primera y segunda ronda de amplificación fueron llevadas a cabo bajo las mismas condiciones de reacción descritas previamente.

Se incorporaron en la PCR anidada, controles positivos (pacientes con la mutación en estudio), controles sanos (individuos sin la patología) y controles negativos (sin templado). Los productos amplificados por RT-PCR anidada fueron evaluados a través de electroforesis en geles de agarosa al 2,5 % teñidos con SYBR™ Safe DNA Gel stain, visualizados con el equipo Axygen® Gel Documentation System y fotodocumentados con Axygen Imaging.

## 6. Purificación de productos y secuenciación automatizada

Los productos de RT-PCR anidada obtenidos por separado, para cada mutación analizada en este estudio, con los cebadores previamente mencionados en el Cuadro 1, fueron purificados empleando el Kit comercial FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen Biotech Corp); siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

Cuadro 3. Cuadro comparativo de los tamaños del producto amplificado por PCR anidada para cada transcrito de fusión, en comparación con los tamaños obtenidos por PCR virtual.

Translocación	Tamaño en PCR virtual	Tamaño obtenido por RT-PCR	% cobertura e identidad	Nº de acceso GenBank
<i>KMT2A/AFF1</i>	502 pb	500 pb	100	OK063986
<i>TCF3/PBX1</i>	289 pb	280 pb	100	OK063985

La amplificación por RT-PCR anidada para la detección de las variantes *p190* y *p210* del transcrito de fusión *BCR/ABL1*, fueron previamente descritas por la UDM-FJC (23).

En relación con la amplificación del transcrito de fusión *KMT2A/AFF1*, este reveló una banda de 500 pb aproximadamente (Figura 1), cuyo tamaño corresponde con el obtenido mediante la PCR virtual (502 pb) empleando la secuencia de referencia para los genes *KMT2A* y *AFF1* (Cuadro 2). La secuencia obtenida se denominó

## 7. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas de MCLAB fueron visualizadas y analizadas empleando el software Mega versión X, y alineadas usando el algoritmo ClustalW. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y comparadas con secuencias reportadas en GenBank, por medio del programa Basic Local Alignment Search Tool - BLASTN; esto con el fin de evaluar el porcentaje de identidad y cobertura de cada una de ellas.

## RESULTADOS

### Transcritos de fusión obtenidos con RT-PCR anidada

Los resultados de la amplificación mediante RT-PCR anidada para la detección de los transcritos de fusión para LLA coincidieron con los obtenidos en la PCR virtual (Cuadro 3).

proteína de fusión *MLL/AF4* y fue publicada en GenBank bajo el número de acceso OK063986. Adicionalmente, se analizó la secuencia con BLASTN y se obtuvo una cobertura e identidad de un 100 % en ambos parámetros, en relación con otras secuencias para el gen *KMT2A* y *AFF1* reportadas (AF87905 y AF31404.1). De igual manera, se identificó el punto de corte para la proteína de fusión *KMT2A/AFF1* en el exón 11 de *KMT2A* (NM\_001197104.2) y en el exón 4 de *AFF1* (NM\_001166693.2), con lo que se confirmó la variante *e11e4* de *KMT2A/AFF1*.

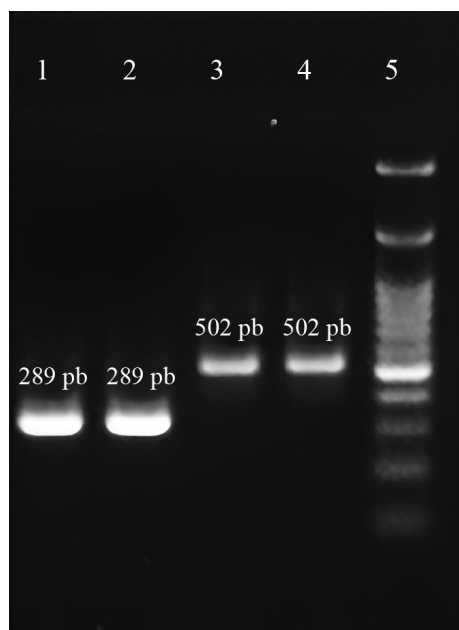


Figura 1. Visualización de los productos de amplificación para los transcritos de fusión del panel LLA. Se visualizan los patrones de bandas obtenidos para cada transcrito de fusión en conjunto con el control positivo de cada translocación. Los controles negativos y sanos para cada transcrito fueron igualmente evaluados. Carril 1: línea celular 697, empleada como control positivo para la translocación *TCF3/PBX1*. Carril 2: paciente (aspirado de médula ósea) seleccionado como control positivo para la translocación *TCF3/PBX1*. Carril 3: línea celular RS4, empleada como control positivo para la translocación *KMT2A/AFF1*. Carril 4: paciente (aspirado de médula ósea) seleccionado como control positivo para la translocación *KMT2A/AFF1*. Carril 5: marcador de tamaño molecular (Promega, 1kb). Los resultados obtenidos para la amplificación de las variantes *p210* y *p190* de la translocación *BCR/ABL*, fueron previamente reportados (23).

La amplificación por RT-PCR anidada para el transcrito de fusión *TCF3/PBX1* reveló una banda de 280 pb aproximadamente (Figura 1). Este tamaño es cercano al que se obtuvo de 289 pb mediante la PCR virtual empleando la secuencia de referencia *TCF3/PBX1* (Cuadro 2). La secuencia obtenida con Mega X se denominó proteína de fusión *E2A/PBX1* y se publicó en GenBank bajo el número de acceso OK063985. Asimismo, se analizó la secuencia con BLASTN y se obtuvo una cobertura e

identidad del 100 % al compararse con otras secuencias (M31522.1) del transcrito de fusión *TCF3/PBX1*. Adicionalmente, se identificó el punto de corte de *E2A/PBX1* en los exones 13 de *TCF3* (NM\_003200.5) y exón 2 de *PBX1* (NM\_002585.4), con lo que se confirmó la presencia de la variante *e13e2* de *TCF3/PBX1*.

## DISCUSIÓN

La LLA es la neoplasia maligna más común diagnosticada en niños en todo el mundo, con una tasa de supervivencia de aproximadamente 90 % en niños y del 75 % al 85 % en adolescentes y adultos jóvenes. Los resultados son menos favorables en los adultos mayores, con una tasa de supervivencia global del 35 %-55 % en las personas de mediana edad y por debajo del 30 % en las personas mayores de 60 años (25,26).

Con base en el impacto que puede generar el diagnóstico preciso de las translocaciones, es necesario contar con una técnica sensible y específica como la RT-PCR anidada, para la correcta detección molecular de estas translocaciones y la adecuada estratificación por riesgo del paciente.

La sensibilidad y eficacia de la RT-PCR anidada depende en gran parte de los cebadores utilizados (27,28). Múltiples estudios a nivel internacional han descrito la importancia de la validación de los cebadores para su uso en RT-PCR anidada (25,29). Para dicha validación, una de las técnicas de laboratorio más empleada es la secuenciación, la cual permite la identificación de genes y variantes (9). La secuenciación por el método de Sanger es la técnica estándar de oro, que proporciona la información definitiva para confirmar las variantes de pequeño tamaño mediante el uso de herramientas bioinformáticas (9,29).

En este trabajo se estandarizó la técnica de PCR anidada, y se validaron y confirmaron los cebadores que se emplean en la detección de las mutaciones *TCF3/PBX1* y *KMT2A/AFF1* en pacientes con LLA, a través de la secuenciación por Sanger de los productos de RT-PCR anidada de dichas translocaciones y el empleo de programas bioinformáticos.

Para el caso del transcrito de fusión *TCF3/PBX1*, se detectó la variante *e13e2*, la cual se encuentra en la mayoría de los casos positivos para la t(1;19) (5-8). En cuanto al transcrito de fusión *KMT2A/AFF1*, se detectó la variante *e11e4*, que es muy rara en niños mayores de 12 meses con LLA (10,11).

Adicionalmente, las secuencias obtenidas en este trabajo fueron publicadas en GenBank, aportando información de relevancia para el avance de la investigación científica a nivel mundial.

En resumen, los cebadores previamente descritos en la literatura y utilizados en la UDM-FJC para la detección de las mutaciones t(1;19) y t(4;11), presentan una alta especificidad y eficiencia, y pueden ser utilizados en pruebas de RT-PCR anidada para el diagnóstico de las mutaciones más comunes en pacientes con LLA.

Los trabajos de secuenciación llevados a cabo para la presente publicación fueron realizados con el único fin de comprobar y validar la especificidad de los cebadores empleados en la Unidad; por lo que no es necesario incluir la secuenciación de los productos de amplificación como parte del protocolo de rutina para pruebas de diagnóstico y detección molecular de oncogenes en laboratorios de biología molecular.

La metodología estandarizada en esta Unidad resulta de muy bajo costo económico en comparación con los diversos estuches comerciales disponibles en el mercado actualmente, lo que permite disminuir y optimizar el uso de recursos en los laboratorios de diagnóstico molecular. De igual manera, mediante esta metodología, es posible ajustar y adecuar las condiciones de amplificación con base en los requerimientos de cada laboratorio y los objetivos planteados que se deseen alcanzar.

Finalmente, los resultados obtenidos durante la estandarización de la técnica presentada, permitirán a la UDM-FJC llevar a cabo el desarrollo de una metodología de PCR Multiplex, para la amplificación simultánea de todas las translocaciones evaluadas para el panel de LLA en muestras de pacientes que acuden a la FJC, permitiendo un mejor uso de recursos, disminuyendo las horas hombre y acortando significativamente el tiempo de respuesta y

entrega de resultados, sin comprometer la efectividad y especificidad de la técnica, y garantizando la confiabilidad y precisión de los resultados.

## CONCLUSIÓN

En la UDM-FJC se estandarizó la técnica de PCR anidada, y se validó y confirmó que los cebadores descritos por van Dongen y col. (1999), pueden usarse de manera confiable para la detección de las mutaciones *TCF3/PBX1* y *KMT2A/AFF1*, en los casos de pacientes referidos a la Unidad.

La determinación de dichas mutaciones se emplea para el diagnóstico y clasificación molecular de la LLA en la población, lo que contribuye fundamentalmente a la estratificación del riesgo de la enfermedad. Al realizar la detección molecular del oncogén específico que desencadena la patología en los pacientes; el equipo médico puede brindar a cada uno de ellos una terapia altamente personalizada y específica para cada una de las translocaciones evaluadas. Existen translocaciones consideradas de mal pronóstico, por lo cual, requieren tratamientos intensivos y más agresivos; mientras que hay mutaciones de buen pronóstico, que cursan con protocolos clínicos de menor intensidad y agentes terapéuticos menos agresivos. Por tanto, conocer la mutación específica de un paciente particular, permite a los médicos orientar el tratamiento de manera individual y personalizada, elevando la calidad de vida del paciente y aumentando además sus niveles de supervivencia.

Este estudio sirve como referencia para otros laboratorios de diagnóstico molecular, debido a que se confirma que los cebadores previamente notificados en la literatura y validados por la UDM-FJC, presentan una alta especificidad y eficiencia en la detección de las mutaciones más frecuentes en pacientes con LLA.

Cabe destacar que las secuencias obtenidas y publicadas en GenBank por la UDM-FJC, son una referencia de las translocaciones en pacientes con LLA en Venezuela. La proporción de los diferentes tipos de leucemia aguda que prevalecen en el país permite hacer comparaciones con



otros países del mundo, en comportamiento y desenlace, lo que proporciona información útil de esta patología.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a los servicios de hemato-oncología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes y el Hospital de Niños “J.M. de los Ríos”, desde los cuales fueron remitidas las muestras de médula ósea estudiadas, así como al St. Jude Children’s Research Hospital por la donación de las líneas celulares usadas como controles positivos en el presente estudio. Adicionalmente, los autores extienden un especial agradecimiento a la Dra. Jeismar Carballo por sus importantes aportes en la revisión y edición del manuscrito. El financiamiento de este trabajo fue realizado por la Fundación Jacinto Convit y la Jacinto Convit World Organization, Inc.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

### REFERENCIAS

1. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: A comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017;7(6):e577.
2. American Cancer Society. Key Statistics for Acute Lymphocytic Leukemia (ALL). American Cancer Society. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/about/key-statistics.html>
3. Globocan WHO. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020. World Health Organ Int Agency Res Cancer. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/862-venezuela-bolivarian-republic-of-fact-sheets.pdf>
4. Rowe JM. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2010;150(4):389-405.
5. Wang Y, Xue Y-J, Lu A-D, Jia Y-P, Zuo Y-X, Zhang L-P. Long-Term Results of the Risk-Stratified Treatment of TCF3-PBX1-Positive Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia in China. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia.* 2020;21(2):137-144.
6. Idfors S, Kuusanmäki H, Kontro M, Majumder MM, Parsons A, Edgren H, et al. Sensitivity and mechanisms of disease progression in relapsed TCF3-PBX1 acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2017;31(1):51-57.
7. Núñez-Enríquez JC, Mejía Aranguré JM. Molecular biology and childhood leukemia: E2APBX1 and central nervous system relapse. *Rev Médica Inst Mex Seguro Soc.* 2015;53(S3):236-239.
8. Pi WC, Wang, Shimada M, Lin JW, Geng H, Lee YL, et al. E2A-PBX1 functions as a coactivator for RUNX1 in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2020;136(1):11-23.
9. 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. *Leukemia.* 1999; 13(12):1901-1928.
10. Pui CH, Campana D. Age-related differences in leukemia biology and prognosis: The paradigm of MLL-AF4-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2007;21:593-594.
11. Godfrey L, Crump NT, O’Byrne S, Lau IJ, Rice S, Harman JS, et al. H3K79me2/3 controls enhancer-promoter interactions and activation of the pan-cancer stem cell marker PROM1/CD133 in MLL-AF4 leukemia cells. *Leukemia.* 2021;35:90-106.
12. Kumar D, Panigrahi MK, Saikia KK, Kapoor G, Mehta A. Molecular analysis of childhood B-acute lymphoblastic leukemia: Identification and prognosis of rare breakpoints. *Mol Biol.* 2015;49(6):843-847.
13. Ramírez-Pacheco A, Moreno-Guerrero SS, Medina-Sanson A. Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. *Gac Mex Oncol.* 2013;12(3):73-162.
14. Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc.* 2019(2).
15. Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A. Overview of Molecular Diagnostics Principles. *Microbiol Molec Diagn Pathol.* 2017:233-257.
16. Marmiroli N, Maestri E. Polymerase chain reaction (PCR). *Food Toxicants Analysis.* 2007:147-187.
17. Wilczynski SP. Molecular Biology. *Modern Surg Pathol.* 2009:85-120.
18. Van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet.* 2018;34(9):666-681.
19. Totomoch-Serra A, Marquez MF, Cervantes-Barragán DE. Sanger sequencing as a first-line approach for

- molecular diagnosis of Andersen-Tawil syndrome. *F1000Research*. 2017;6:1016.
20. Godoy M. Estudio molecular de la leucemia mieloide aguda en Venezuela [Tesis Doctoral]. [Caracas; Venezuela]: Universidad Simón Bolívar, 2013.
  21. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*. 2003;3(1):18.
  22. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-410.
  23. Rivodó T, Núñez JM, Rodríguez BV, Duarte MA, Porco A, Escobar DA, et al. Estandarización de la técnica PCR anidada para la detección de las translocaciones *PML/RAR $\alpha$* , *RUNX1/RUNX1T1* y *BCR/ABL1* en pacientes con leucemia mieloide aguda remitidos a la Unidad de Diagnóstico Molecular de la Fundación Jacinto Convit. *Gac Méd Caracas*. 2023;131(3):563-574.
  24. Sequence Extractor - About. Disponible en: <https://www.bioinformatics.org/seqext/about.html>
  25. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood J Am Soc Hematol*. 2000;96(10):3343-3356.
  26. Yu W, Wang W, Yu X. Investigation of lncRNA-mRNA co-expression network in ETV6-RUNX1-positive pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*. 2021;16(6):e0253012.
  27. Kalendar R, Muterko A, Shamekova M, Zhambakin K. In Silico PCR Tools for a Fast Primer, Probe, and Advanced Searching. *Meth Molec Biol*. 2017;1620:1-31.
  28. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre-y postnatal. *Diagnóstico Prenat*. 2012;23(2):56-66.
  29. Cañizalez J, Rojas A, Urdaneta K, Atencio R, González R, Soto M, et al. Transcritos del gen BCR-ABL, en pacientes con leucemia Mieloide crónica en Venezuela. *Saber*. 2012;27(3):422-429.