

Onco-Hematología: Contribución de la PCR en Tiempo Real

Dra. Marina I. Gutiérrez
Laboratorio Dr. Stamboulian.
División Biología Molecular.
Buenos Aires

PCR en tiempo real

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real es un método altamente sensible que requiere muestras muy pequeñas, es decir que con muy poco material biológico se pueden obtener resultados y muy rápidamente (1 hora). Como la PCR convencional, puede ser utilizada para determinaciones cualitativas pero, a diferencia de aquella, es también una herramienta cuantitativa (Q-PCR). Es justamente esta propiedad la que ha convertido a la PCR en tiempo real en la vedette de los laboratorios de Biología Molecular de última generación.

La PCR en tiempo real permite amplificar y simultáneamente detectar el producto amplificado, en cada ciclo de amplificación, ya que el amplicon es revelado midiendo la señal fluorescente a medida que se va produciendo. La intensidad de la fluorescencia en cada ciclo es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR en cada ciclo y esto depende de la cantidad inicial de templado. Por esto, la cuantificación está facilitada, a diferencia de la PCR convencional donde se evalúa el resultado final. La PCR en tiempo real también permite que varias reacciones se realicen en un mismo tubo (multiplex). Como no requiere manipulación post-PCR, se pueden reducir significativamente los riesgos de contaminación. Este aspecto es aún más notorio si tenemos en cuenta que la alta sensibilidad de la PCR en tiempo real permite reemplazar PCRs nested.

Esta nueva herramienta de la Biología Molecular es aplicable a todas las áreas de la Medicina: enfermedades infecciosas, hematología, oncología, trasplante de órganos, genética, farmacogenética, etc. Se han desarrollado kits, pero todavía son limitados y la mayoría de ellos no permite una cuantificación absoluta, sino una cuantificación relativa (diferencia o índice con respecto a una referencia o calibrador). Estos datos son suficientes para cierto tipo de estudios, pero no para otros donde una cuantificación absoluta es más informativa. Por eso, los métodos "caseros" (desarrollados artesanalmente en el propio laboratorio) siguen siendo muy usados en las PCR en tiempo real. Sin embargo, deben utilizarse en forma apropiada conociendo sus limitaciones. La utilización de standards (comerciales o caseros) y un estricto control de la variabilidad entre corridas y de la reproducibilidad del standard son indispensables.

La PCR en tiempo real utiliza distintas metodologías según la química de las reacciones. Las más utilizadas son: el Sybr Green I (se une al ADN doble cadena), sondas de hibridización (transferencia de energía de un fluorocromo dador a otro receptor cuando están próximos, FRET) o sondas de hidrólisis (un fluorocromo se detecta cuando se separa de otro fluorocromo quencher debido a la acción de la polimerasa, Taqman, molecular beacons, scorpion) (**Figura 1**). Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas y desventajas y la elección de uno u otro depende del tipo de ensayo a desarrollar. Por ejemplo, la química que utiliza el Sybr Green I es fácilmente aplicable a una gran diversidad de reacciones, es el más económico, pero la detección no es muy específica ya que se detecta ADN doble cadena, incluyendo productos espúreos o dímeros de primers si los hubiera en la reacción. Para lograr información específica se agrega un ciclo que permite identificar inequívocamente cada producto de PCR ya que cada amplicon tiene una T_m característica (temperatura en la cual el 50% del producto de PCR está desnaturalizado). La T_m es una característica propia y altamente reproducible de cada amplicon que depende no sólo del tamaño, sino también del contenido de GC y de la secuencia. Las otras químicas, en cambio, se basan en el uso de sondas internas marcadas con al menos dos fluorocromos. Si bien esto da especificidad durante la detección, el costo de los ensayos se encarece. Esto es más notorio cuando se realizan reacciones multiplex. En condiciones apropiadas, el Sybr Green I permite identificar 2 ó 3 productos diferentes en una misma reacción sin necesidad de reactivos adicionales (**Figura 2**), en

cambio, utilizando la química del Taqman, se requieren distintos fluoróforos para cada producto y un equipo que permita detectar los distintos colores.

Varias compañías han producido termocicladores para tiempo real. Las más comercializadas son el LightCycler (Roche) y el ABI Prism (Applied Biosystems), otros equipos son de BioRad, Stratagene, MJ Research, etc. Un estudio reciente sugiere que todos son comparables y que la elección debe basarse en el uso que se le dará, cuántas muestras necesitan analizarse por corrida, etc.

La PCR en tiempo real contribuye al diagnóstico de enfermedades Hemato-Oncológicas

Hoy sabemos que las alteraciones genéticas de las neoplasias son, generalmente, los agentes causales de la patología y definen distintos comportamientos biológicos, que se traducen en distintos comportamientos clínicos. Por eso, es importante para el hematólogo, por ejemplo, saber qué tipo de leucemia aguda tiene un paciente para definir el tratamiento. El correcto diagnóstico de enfermedades oncohematológicas se basa en resultados de múltiples ensayos, incluyendo la clínica, morfología, citoquímica, inmunofenotipo, citogenética y biología molecular. La identificación de alteraciones genéticas específicas (marcadores tumorales) es actualmente un elemento indispensable para la subclasificación de las neoplasias y para la estratificación de los pacientes en grupos con distintos pronósticos. Cuánto más precisos se hacen los diagnósticos, los pacientes reciben el tratamiento más adecuado para su enfermedad.

Las alteraciones genéticas más frecuentes en neoplasias hematológicas son las translocaciones cromosómicas, las pérdidas de material genético (deleciones o monosomías cromosómicas) y las ganancias de material genético (duplicaciones/amplificaciones o trisomías cromosómicas). Todas estas anomalías se pueden detectar por PCR en tiempo real. La siguiente tabla muestra las determinaciones por Biología Molecular más utilizadas en el diagnóstico y la predicción de recaídas en leucemias.

LLA precursor B	genes	Frecuencia (%)# Adultos Niños		Pronóstico	Técnica	Aplicación
t(12;21)	TEL-AML1	1-2	20-30	bueno (debatido)	RT-PCR Q-PCR	Dx Dx, seguimiento*
t(9;22)	mBCR-ABL	25-40	5-7	Mal	RT-PCR Q-PCR	Dx Dx, seguimiento
t(1;19)	E2A-PBX1	3-4	5-8	Mal	RT-PCR Q-PCR	Dx, seguimiento Dx, seguimiento*
t(4;11)	MLL-AF4	3-4	3-5	Mal	RT-PCR Q-PCR	Dx, seguimiento Dx, seguimiento*
T-LLA						
Del TAL1	SIL-SCL	5-10	10-25	poca información	PCR, RT-PCR Q-PCR	Dx, seguimiento Dx, seguimiento*
LMA						
t(15;17)	PML-RAR α	3	8-10	bueno con terapia especif.	RT-PCR Q-PCR	Dx, seguimiento Dx, seguimiento*
t(8;21)	AML1-ETO	3-5	10-15	bueno	RT-PCR Q-PCR	Dx Dx, seguimiento
Inv(16)	CBF β -MYH11	2-5	5-6	bueno	RT-PCR Q-PCR	Dx Dx, seguimiento

LMC						
t(9;22)	MBCR-ABL	~100	~100	terapia específica	RT-PCR Q-PCR	Dx Dx, seguimiento

Estas frecuencias corresponden a la literatura mundial pero pueden variar en distintas regiones.

* Controvertido, no está probado todavía que la Q-PCR sea más informativa en la predicción de recaídas, salvo en casos especiales.

Por otra parte, la determinación de la patología molecular subyacente permite identificar pacientes que se beneficiarán con terapias biológicas dirigidas a una alteración particular. Los ejemplos más conocidos son la leucemia mieloide aguda PML-RAR α que responde al tratamiento con ácido retinoico y las leucemias BCR-ABL positivas que se tratan con Imatinib (inhibidor de esta tirosina quinasa).

A medida que fue evolucionando el conocimiento sobre las neoplasias hematológicas, también evolucionaron los métodos diagnósticos moleculares. Así, se pasó del Southern blot para detectar la presencia de translocaciones cromosómicas, a la PCR o RT-PCR (retro-transcripción + PCR para amplificar el cADN) y más recientemente a la PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real también está reemplazando a las hibridaciones alelo-específicas para identificar mutaciones en tumores, a los Southern/dot blots semicuantitativos para determinar amplificaciones génicas y a las PCR-RFLP para determinar genotipos de mayor riesgo de toxicidad a la quimioterapia.

Estos mismos conceptos se aplican a los linfomas, donde también se definen subtipos moleculares en base al diagnóstico molecular. En este ámbito, otra herramienta molecular es el análisis del perfil de expresión génica por microarrays. Estos nuevos datos están modificando la clasificación de los linfomas y aunque todavía forman parte de estudios de investigación, son muy laboriosos y costosos, requieren equipamiento y personal altamente entrenado, la aplicación clínica llegará en pocos años más. El aspecto más relevante para la clínica diaria es que los microarrays están identificando nuevos marcadores tumorales diagnósticos, pronósticos, de respuesta o toxicidad, que una vez confirmados y validados pasarán al laboratorio de diagnóstico clínico utilizando metodologías más accesibles, como la PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real permite monitorear las enfermedades Hemato-Oncológicas

Los marcadores tumorales específicos también se utilizan para el seguimiento de los pacientes y evaluación de la respuesta al tratamiento. Para esto, la posibilidad de cuantificación de la PCR en tiempo real es fundamental, ya que permite el monitoreo de la carga tumoral existente en cada etapa de la terapia, identificando así pacientes respondedores y no-respondedores y permitiendo tomar las correspondientes decisiones terapéuticas.

Con el advenimiento de nuevas técnicas moleculares surgió el concepto de enfermedad mínima residual (no detectable por la clínica ni por análisis hematológico), que a su vez, fue cambiando con el tiempo según la sensibilidad de la metodología utilizada. Estas técnicas moleculares permiten aumentar la sensibilidad, ya que el límite de detección es 3-4 órdenes de magnitud menor. Actualmente, se evalúa la existencia de enfermedad mínima residual por PCR o RT-PCR y cuando el resultado es negativo se informa como "remisión molecular", otro concepto surgido del avance tecnológico.

El advenimiento de las técnicas moleculares y la implementación de terapias biológicas, dirigidas a blancos moleculares específicos, avanzaron simultáneamente y lograron una mejora en la sobrevida de los pacientes. El mejor ejemplo lo constituye la leucemia mieloide crónica (LMC), primer tumor maligno donde se identificó una alteración cromosómica causante de la enfermedad (el cromosoma Filadelfia). Después de una lógica evolución, se estableció que el cromosoma Filadelfia era en realidad una translocación cromosómica [t(9;22)] y que los genes participantes [BCR y ABL] eran críticos en el proceso patogenético, culminando con el desarrollo de una droga dirigida a esta alteración molecular [STI571 o Imatinib]. Este inhibidor de la actividad de tirosina quinasa de la proteína quimérica BCR-ABL se une al sitio de unión del ATP, impidiendo así el

funcionamiento normal de esta enzima. Actualmente, este es el tratamiento de primera línea en LMC. Simultáneamente al avance terapéutico se hizo necesario monitorear respuestas por métodos moleculares, y la PCR cuantitativa está ampliamente difundida y aceptada (**Figura 3**). Ya está demostrado que la PCR cuantitativa se correlaciona bien con la respuesta citogenética, método standard de los últimos años. Como la cuantificación de células tumorales residuales se correlaciona con el resultado clínico, la detección de enfermedad mínima residual hoy en día se utiliza rutinariamente para guiar la terapia así como para evaluar nuevas modalidades terapéuticas.

Los estudios cuantitativos de BCR-ABL se realizan por RT-PCR en tiempo real. En estos casos, es necesario cuantificar también un gen control (housekeeping) como gen de referencia normalizador. Se han propuesto varios genes para garantizar la calidad y cantidad de ARN analizado y para normalizar los resultados pudiendo así compararse datos de distintas determinaciones a lo largo del tiempo (cinética). El gen control más utilizado en neoplasias hematológicas es el ABL. Así, los resultados se expresan como la relación N° de copias BCR-ABL / N° de copias ABL. A pesar de los numerosos trabajos publicados en este tema, todavía no existe un consenso internacional para establecer los valores de corte. Este aspecto es crítico en la PCR en tiempo real en general y requiere un intercambio de información entre el médico y el laboratorio para su correcta interpretación. Por esta razón, es necesario hacer un seguimiento de los pacientes y observar la cinética de la respuesta a la terapia (los cambios en la cuantificación en varios estadios del tratamiento), en lugar de un valor aislado que por sí solo no es informativo. Este aspecto va a mejorar día a día hasta que este tipo de estudios estén más estandarizados y difundidos. Los resultados de BCR-ABL/ABL se expresan generalmente como porcentaje o como reducción de logs con respecto a la muestra del diagnóstico. Esto demuestra también la importancia de estudiar desde la primera muestra, haciendo seguimientos apropiados, que en el caso de la LMC suele ser cada 3 meses. Algunos valores indicativos, tomados de la bibliografía sugieren:

$\frac{\text{BCR-ABL} \times 100}{\text{ABL}} \leq 0,05$ o reducción de ≥ 3 log corresponden a una remisión molecular mayor

$\frac{\text{BCR-ABL} \times 100}{\text{ABL}} \leq 0.005$ o reducción de ≥ 4 log corresponden a una remisión molecular completa

Un apropiado seguimiento de los niveles de transcritos BCR-ABL permite también predecir resistencia cuando se observa un aumento en la relación BCR-ABL/ABL que persiste en muestras consecutivas. La resistencia a los inhibidores de tirosina quinasa de primera generación (STI571/Imatinib) se debe en su mayor parte a mutaciones puntuales en el gen quimérico BCR-ABL. Compañías farmacéuticas ya desarrollaron drogas relacionadas al Imatinib, de segunda generación, que están siendo evaluadas clínicamente como opción de tratamiento para pacientes con recidivas por la aparición de resistencia.

La Biología Molecular ha contribuido en la clínica oncohematológica por más de dos décadas y con la continua aparición de nuevas técnicas y nuevas terapias siguen surgiendo nuevos avances y mejoras. Está claro hoy en día que la PCR en tiempo real es una herramienta importante pero se requiere aún más trabajo de estandarización y establecimiento de valores de corte para su correcta interpretación clínica. Una fluida comunicación entre el laboratorio y la clínica facilita este proceso de aprendizaje mutuo.

Lecturas sugeridas:

- Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfer Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 299-305.
- Rubnitz JE et al. Molecular diagnostics in the treatment of leukemia. *Curr Opin Hematol* 1999; 6: 229-235.

- Gabert J et al. Standardization and quality control studies of real-time quantitative reverse transcriptase PCR of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe against cancer program. *Leukemia* 2003; 17: 2318-2357.
- Beillard E et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using real-time quantitative reverse transcriptase PCR – A Europe against cancer program. *Leukemia* 2003; 17: 1-13.
- Jaeger U et al. Monitoring minimal residual disease in AML: the right time for real time. *Ann Hematol* 2003; 82: 139-147.
- Hughes T et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors – review and recommendations for ‘harmonizing’ current methodology for detecting *BCR-ABL* transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood First Edition Paper*, prepublished online March 7, 2006; DOI 10.1182/blood-2006-01-0092.
- Hughes T et al. Molecular monitoring of BCR–ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. *Blood Reviews* 2006; 20: 29–41.

Figura 1: Formatos más utilizados en la PCR en tiempo real

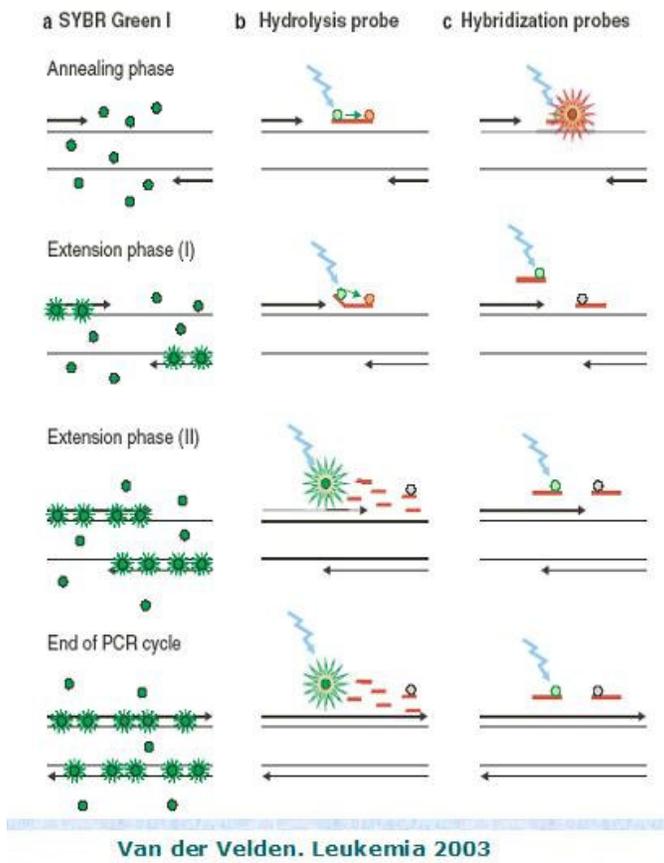


Figura 2: Detección de 3 translocaciones cromosómicas y un control interno (HPRT) en una sola reacción por PCR en tiempo real multiplex. RS4; 11: control positivo de t (4; 11), REH: control positivo de t (12; 21) y 697: control positivo de t (1; 19).

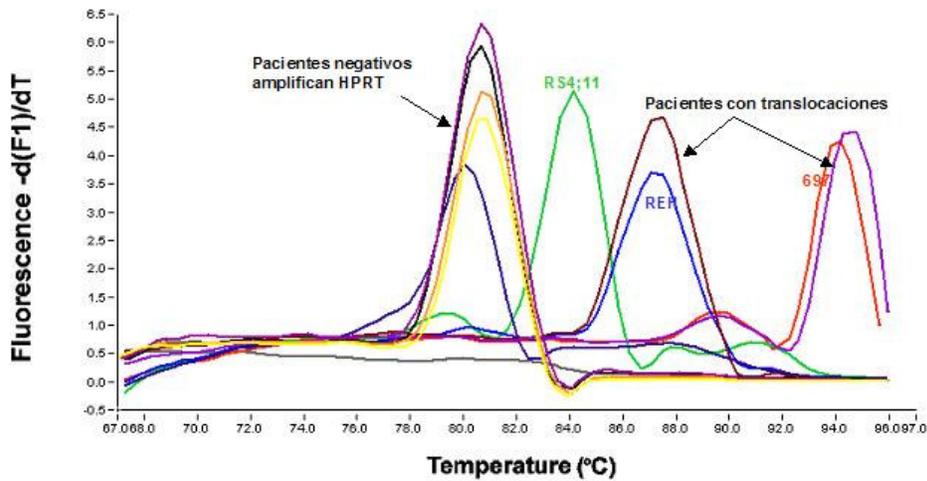
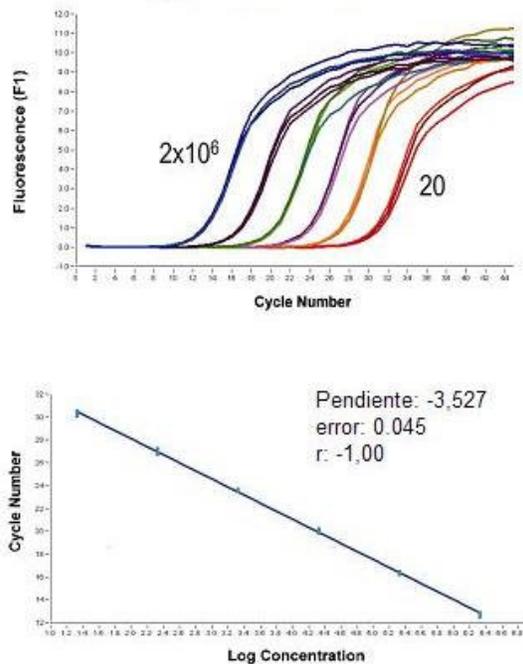


Figura 3: Cuantificación de BCR-ABL por PCR en tiempo real. Los números del panel superior indican el número de copias de un estándar en diluciones seriadas (1:10). El gráfico inferior muestra la curva generada por el equipo.



Revista

bi**análisis**

