

Cuantificación de los transcriptos BCR-ABL1 y evaluación de la respuesta molecular en Leucemia Mieloide Crónica

BCR-ABL1 transcripts quantification and molecular response evaluation in chronic myeloid leukemia

Michele Bianchini¹, Irene Larripa²

¹-CIO-FUCA, Instituto A. Fleming de Buenos Aires

²-IMEX, CONICET-ANM/IIHEMA. Academia Nacional de Medicina

ibl@hematologia.anm.edu.ar

Fecha de recepción: 25/07/14
Fecha de aprobación: 31/07/2014



LABORATORIO EN
HEMATOLOGÍA

HEMATOLOGÍA, Vol.18 N° 2: 164-168
Mayo - Agosto 2014

La LMC se caracteriza por la presencia del cromosoma Philadelphia (Ph⁺) producto de la translocación entre los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(q34;q11)] originando el gen de fusión *BCR-ABL1*. El cromosoma Ph⁺ se detecta en más del 95% de los casos con LMC al diagnóstico, mientras que en los casos restantes la translocación puede ser críptica, lo cual implica demostrar el reordenamiento *BCR-ABL1* por otras metodologías ya sea por hibridización *in situ* (FISH) o biología molecular.

El manejo de la LMC ha sufrido una profunda evolución desde la aparición de los inhibidores de tirosina kinasa (ITK) cambiando favorablemente el pronóstico de los pacientes. En la última década se ha alcanzado un enorme consenso sobre el tratamiento y monitoreo de la enfermedad residual. El estudio IRIS (International Randomized Study of Interferon and STI571) (Hughes 2003) demostró claramente que la respuesta molecular mayor (RMMa) o el des-

censo de 3 log en la expresión del *BCR-ABL1* respecto del nivel basal era clave para el pronóstico del paciente.

Actualmente se considera que los estudios genéticos son imprescindibles para el diagnóstico y seguimiento de la LMC. El análisis citogenético con técnicas de bandeado cromosómico se debe realizar en médula ósea (MO) al momento del diagnóstico para identificar el cromosoma Ph⁺ y para evaluar el grado de respuesta citogenética a los 3, 6 y 12 meses de tratamiento. Las respuestas citogenéticas se clasifican en base al porcentaje de células Ph⁺ en 20 metafases analizadas en: Completa (RCC: 0%), Parcial (RCP: ≤ 35%), Menor (RCMe: ≤ 65%), Mínima (RCMi: ≤ 95%) o Nula (RCN: > 95%). Los estudios de FISH se realizan al diagnóstico solamente cuando se sospecha un cromosoma Ph⁺ enmascarado o críptico o durante el seguimiento cuando los preparados cromosómicos presentan muy bajo índice mitótico.

En estos casos la aplicación de las sondas de FISH sobre los extendidos citogenéticos de MO, no informativos, puede ser muy útil respecto a la presencia o ausencia del rearrreglo *BCR-ABL1*. El estudio de seguimiento por FISH en sangre periférica (SP) solo se recomienda después que el paciente ha alcanzado la RCC en MO; ésta se corresponde con $\leq 1\%$ de núcleos interfásicos *BCR-ABL1* positivos en 200-300 núcleos analizados de SP por FISH. Los estudios moleculares de cuantificación de la enfermedad residual se basan en la evaluación de los transcritos del gen de fusión *BCR-ABL1* en leucocitos de sangre periférica, aplicando técnicas moleculares de retrotranscripción y posterior amplificación cuantitativa por PCR.

La calidad del ARN es posiblemente el parámetro de mayor importancia para la reproducibilidad y significado biológico. El ARN de alta calidad es esencial, porque cuando se encuentra degradado o con impurezas no responde correctamente a la mayoría de las enzimas utilizadas en la reacción. Si bien las muestras de sangre periférica (7-10ml) deben ser extraídas con EDTA, ésta sufre una degradación de aproximadamente el 20% cada 24 horas cuando se mantienen a temperatura ambiente, por lo tanto es conveniente realizar la extracción en tubos que posean una solución estabilizante del ARN (Paxgene) cuando se trata de muestras que demoran más de un día en llegar al laboratorio. Para realizar la separación de los glóbulos blancos el uso de Ficoll no es recomendable porque el fraccionamiento celular determina menor sensibilidad que el análisis basado en el total de leucocitos luego de la lisis de los glóbulos rojos. La retrotranscripción se puede realizar con la enzima MMLV o con la enzima Superscript III que permite la síntesis del cDNA y posterior amplificación en una etapa (*one-step*). Para realizar la amplificación en tiempo real tanto las tecnologías de hidrólisis como las de hibridación son apropiadas y comparables siguiendo los protocolos estandarizados y validados recomendados por European Against Cancer (Gabert, 2003). Las curvas de calibración pueden ser realizadas con estándares de RNA o DNA. Los plásmidos que contienen ambas secuencias (target y control) son más aconsejables porque producen menor variabilidad. El coeficiente de correlación de la curva estándar debería ser $\geq 0,98$ para garantizar la linealidad del ensayo. En cada corrida es necesario incluir controles de calidad de alto y bajo

nivel de *BCR-ABL1* para monitorear el rendimiento del ensayo. El límite de detección a partir del cual se considera una muestra positiva está representada por la menor dilución plasmídica (*BCR-ABL1*) que puede ser amplificada eficientemente (3-10 copias). El número de copias de *BCR-ABL1* detectado en una muestra se informa relativo al número de copias del gen control (*ABL1*) expresado en porcentaje [$(\text{BCR-ABL1}/\text{ABL1}) \times 100$].

Durante la remisión de la enfermedad los parámetros hematológicos y citogenéticos son los que alcanzan normalización con mayor rapidez, debido a que utilizan metodologías (citológicas y citogenéticas) de menor sensibilidad. Sin embargo utilizando técnicas de biología molecular de mayor sensibilidad se ha podido demostrar la persistencia de células tumorales (*BCR-ABL1* positivas). Por lo tanto actualmente la metodología empleada para evaluar la profundidad de la respuesta molecular (RM) es la PCR cuantitativa en tiempo real de los transcritos *BCR-ABL1* (qRT-PCR *BCR-ABL1*). Los numerosos pasos pre-analíticos y analíticos necesarios, determinan que esta metodología presente alta variabilidad inter-laboratorios debido fundamentalmente al uso de diferentes genes control (p.ej. *ABL*, *BCR*, *GUSB*), utilización de diferentes sondas de hidrólisis (Taqman) o de hibridación (FRET), implementación de distintos equipos de Real Time, diseño de diversos primers y sondas en cada laboratorio. Incluso se ha podido observar variaciones entre laboratorios que utilizan el mismo kit comercial. La gran variación en la medición cuantitativa del *BCR-ABL1* dificulta los estudios comparativos entre los distintos laboratorios. Por este motivo, en el año 2005, se propuso armonizar los resultados cuantitativos de *BCR-ABL1* a la escala internacional (*EI*). Para ello se consideró apropiado utilizar los valores previamente definidos en el estudio IRIS, es decir el 100% de transcritos corresponde al nivel basal en *EI* y el valor de 0,1% representa una RMMa en *EI* (Hughes 2006). Para que cada laboratorio local pueda informar en la *EI* es necesario convertir los datos a través de un factor de conversión (FC) obtenido mediante comparación con un set de muestras de valor conocido en *EI*.

El protocolo IRIS y seguimiento posteriores (Druker, 2006) demostraron que el 87% de los pacientes en la rama imatinib alcanzaban una respuesta citogenética completa (RCC), la cual se mantenía estable en casi todos los casos. La mayoría de estos pacientes

también alcanzaron la RMMa ($\leq 0,1\%$ BCR-ABL1 IS), sin embargo solo una minoría había logrado respuesta molecular completa (RMC) definida como $\leq 0,01\%$ BCR-ABL1 IS (Baccarani, 2013). Con el advenimiento de los ITK de segunda generación la proporción de pacientes que alcanzaron RMC y con diferente grado de profundidad se incrementó significativamente. A partir de estos resultados no hubo consenso en seguir utilizando el término RMC, dado que éste está definido a partir de un límite y que la enfermedad puede ser aún detectable en niveles inferiores dependiendo de la sensibilidad del método empleado, por lo tanto se aconseja utilizar la denominación respuesta molecular (RM) (Cross, 2012), estableciendo límites para definirla.

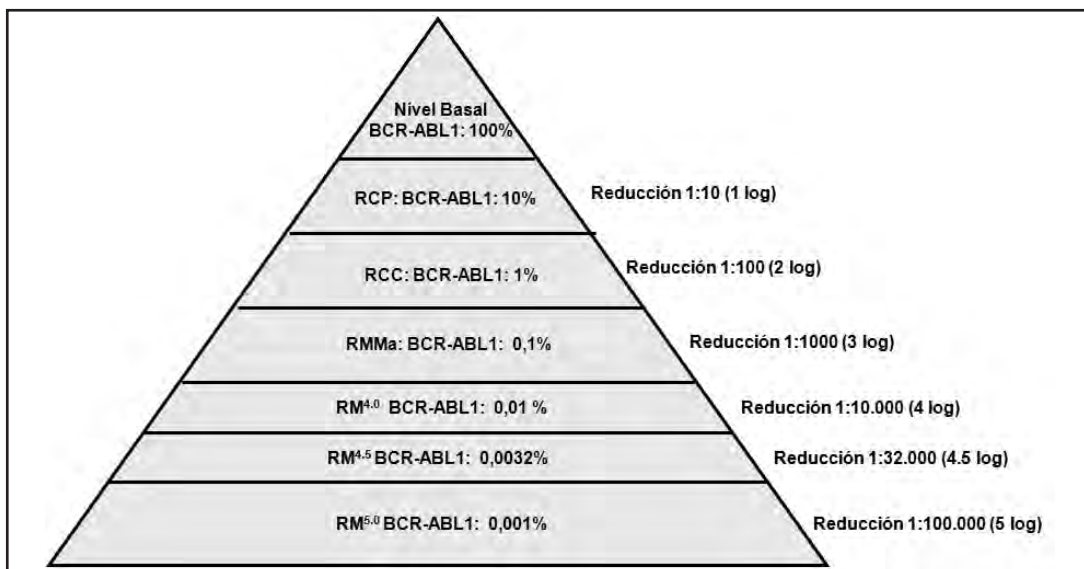
Para ello se tuvo en cuenta que la RMMa corresponde a $\leq 0,1\%$ de BCR-ABL1 en EI (lo cual implica una reducción de ≥ 3 log), los términos RM4.0, RM4.5 y RM5.0 indican niveles de transcritos de $\leq 0,01\%$ BCR-ABL1 en EI (≥ 4 log de reducción), $\leq 0,0032\%$ BCR-ABL en EI (≥ 4.5 log de reducción) y $\leq 0,001\%$ BCR-ABL en EI (≥ 5.0 log de reducción) respecto del valor basal (100%) (Cross, 2012).

Considerando estos niveles de respuesta hay que tener en cuenta que cuando las copias de BCR-ABL1 son indetectables para poder informar la RM en EI se debe exigir un número mínimo de copias del gen control de 10.000, 32.000 y 100.000 para informar RM4.0, RM4.5 y RM5.0 respectivamente (Tabla 1) (Figura 1).

Tabla1: Criterios de Respuesta Molecular en EI

% BCR-ABL1/ABL1	Red Log est	Resp. Molecular	Nº copias gen ABL1
$\leq 0,001\%$ o indetectable	≥ 5.0 log	RM 5.0	≥ 100.000
$\leq 0,0032\%$ o indetectable	≥ 4.5 log	RM 4.5	≥ 32.000
$\leq 0,01\%$ o indetectable	≥ 4.0 log	RM 4.0	≥ 10.000
$\leq 0,1 - 0,01\%$	≥ 3.0 log	RMMayor	
$\leq 1 - 0,1\%$	≥ 2.0 log	RMMenor	
$\leq 10 - 1\%$	≥ 1.0 log	RMMinima	
$> 10\%$	< 1.0 log	RMNula	

Figura 1: Nivel de respuesta Molecular en Escala Internacional (EI)



RCC: Respuesta Citogenética Completa, RCP: Respuesta Citogenética Parcial, RMMa: Respuesta Molecular Mayor, RM4: Respuesta Molecular con 4 logaritmos decimales de reducción, RM4.5: Respuesta Molecular con 4.5 logaritmos decimales de reducción, RM5.0: Respuesta Molecular con 5 logaritmos decimales de reducción.

La necesidad de armonizar los resultados determina que los diferentes laboratorios deban obtener un factor de conversión (FC) que les permita estandarizar el resultado a la *EI*.

Los estándares originales utilizados en el estudio IRIS se fueron agotando, sin embargo la trazabilidad de la *EI* se mantuvo a través de controles de calidad elaborados en el laboratorio de la Dra. Susan Branford en Adelaida. Para posibilitar que los laboratorios tengan acceso a la *EI*, el mencionado laboratorio inició un proceso de validación mediante intercambio de muestras (previamente evaluadas) lo cual posibilitó la obtención de un FC que permite convertir los datos locales a la *EI*, mientras no haya ningún cambio en la metodología validada.

Muchos laboratorios con FC validados se han establecido como laboratorios de referencia a nivel nacional o regional y han podido determinar un FC para los diferentes centros locales evaluados (Muller, 2009). Si bien este proceso ha funcionado correctamente, el establecimiento del FC es complejo, insume mucho tiempo, es costoso y por lo tanto está limitado a un número de laboratorios en un dado momento. Esto determinó el desarrollo de métodos alternativos mediante el diseño de calibradores acreditados como

reactivos primarios de referencia (WHO International Reference Panel) (White, 2010) para el análisis de *BCR-ABL1* por qRT-PCR. Estos calibradores se elaboraron a partir de mezclas de células liofilizadas provenientes de las líneas K562 (Ph+) y HL60 (Ph-) en 4 diferentes proporciones abarcando un rango de valores de 10% - 0,01%. Dado que la cuantificación del *BCR-ABL1* se efectúa en relación a un gen control, el cual permite normalizar las variaciones en calidad y cantidad del cDNA, los calibradores incluyen el valor relativo a 3 genes de referencia: *ABL*, *BCR* y *GUSB* con la finalidad que pueda ser utilizado en diferentes laboratorios.

Trabajos recientes demuestran que dentro de los factores pronósticos independientes para evaluar la respuesta al tratamiento se encuentran la reducción de la carga tumoral y el tiempo en lograr dicha respuesta. Por todo lo expuesto el estudio de la RM constituye un dato de gran relevancia en el seguimiento de la LMC. Teniendo en cuenta estos nuevos conceptos el European Leukemia Net (ELN, Baccarani, 2013) ha elaborado una serie de recomendaciones para evaluar la respuesta al tratamiento teniendo en cuenta el estudio citogenético y qRT-PCR en *EI* a los 3, 6 y 12 meses de tratamiento (Tabla 2).

Tabla 2: Definición de respuesta al tratamiento en primera línea (con cualquier inhibidor) (European Leukemia Net, Baccarani 2013)

	Óptima	Alerta	Falla
Al inicio	No corresponde	ACC/Ph+ (ruta mayor)	No corresponde
3 meses	Ph+ ≤ 35% y/o BCR-ABL1 ≤ 10%	Ph+ 36-95% y/o BCR-ABL1 ≥ 10%	Falta de RHC y/o Ph+ > 95%
6 meses	Ph+ 0% y/o BCR-ABL1 < 1%	Ph+ 1-35% y/o BCR-ABL1 1-10%	Ph+ > 35% y/o BCR-ABL1 > 10%
12 meses	BCR-ABL1 ≤ 0,1%	BCR-ABL1 > 0,1-1%	Ph+ ≥ 0% y/o BCR-ABL1 > 1%
En cualquier momento	BCR-ABL1 ≤ 0,1%	ACC/Ph- (-7 o 7q-)	Pérdida de RMC Pérdida de RCC Pérdida de RMMa Mutaciones ACC/Ph+

ACC: Alteraciones Cromosómicas Clonales, *RHC:* Respuesta Hematológica Completa, *RCC:* Respuesta Citogenética Completa, *RMMa:* Respuesta Molecular Mayor

Entre respuesta óptima y falla hay una zona intermedia denominada “*warning*” o alerta en la cual el paciente debería estar monitoreado más frecuentemente, los casos que tienen criterios de falla deberían recibir un cambio en el tratamiento, mientras que los casos con respuesta óptima continuarían con la terapia o podrían incluirse en protocolos de discontinuación del tratamiento una vez que han alcanzado una respuesta molecular profunda y estable. Actualmente los estudios de cuantificación de la respuesta molecular son de fundamental importancia pues la profundidad y duración de la respuesta se asocian con remisiones más estables y menor probabilidad de progresión, permitiendo seleccionar pacientes que puedan ingresar en protocolos de discontinuación del tratamiento con ITK.

Abreviaturas

EI: International Scale
 FC: Factor de Conversión
 FISH: Fluorescencia in situ hibridización
 ITK: Inhibidor de Tirosina Kinasa
 LMC: Leucemia Mieloide Crónica
 MO: Médula ósea
 PCR: Polimerasa Chain Reaction
 qRT-PCR: Retrotranscripción y posterior PCR cuantitativa
 RHC: Respuesta Hematológica Completa
 RCC: Respuesta Citogenética Completa
 RCP: Respuesta Citogenética Parcial
 RCMe: Respuesta Citogenética Menor
 RCMi: Respuesta Citogenética Mínima
 RCN: Respuesta Citogenética Nula
 RM: Respuesta Molecular
 RMC: Respuesta Molecular Completa
 RMMa: Respuesta Molecular Mayor
 RMMe: Respuesta Molecular Menor
 RMMi: Respuesta Molecular Mínima
 RMN: Respuesta Molecular Nula
 RT-PCR: Retrotranscripción y posterior PCR
 SP: Sangre Periférica

Bibliografía

- Bacarani M, Deininger M, Rost G, et al. European Leukemia Net recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 122: 872-884, 2013
- Druker B, Guilhot F, O'Brien S, et al. Five-year follow up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Medicine* 355: 2408-17, 2006.
- Cross N, White H, Muller M, Saglio G, Hochhaus A. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 26, 2172-2175, 2012.
- Gabert J, Beillard E, van der Velden V et al. Standardization and quality control studies of real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia: a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 17:2318-2357, 2003.
- Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia (IRIS). *N Engl J Med* 349: 1423 – 1432, 2003.
- Hughes TP, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, 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* 108: 28-37, 2006.
- Muller M, Cross N, Erben P. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia* 23: 1957-1963, 2009.
- White H, Matejtschuk P, Rigsby P, et al. Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* 116: e111-e117, 2010.

Declaración de conflictos de interés:

Las autoras declaran no tener conflictos de interés.