

## Técnicas de citogenética y biología molecular para el diagnóstico y seguimiento de la leucemia promielocítica

### Cytogenetic and molecular biology techniques for the diagnosis and monitoring of promyelocytic leukemia

Ana María Amor Vigil<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9182-2664>

Kalia Lavaut Sánchez<sup>1</sup> <http://orcid.org/0000-0001-6906-2259>

Carmen Alina Díaz Alonso<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6544-0662>

<sup>1</sup>Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana. Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [rchematologia@ifomed.sld.cu](mailto:rchematologia@ifomed.sld.cu)

#### RESUMEN

**Introducción:** La leucemia promielocítica es un subtipo de leucemia mieloide aguda que se presenta frecuentemente con una coagulopatía potencialmente mortal, por lo que representa una emergencia médica. En la gran mayoría de los pacientes ocurre la t(15;17)(q24;q21) que genera el gen aberrante PML-RARA. Mediante diferentes técnicas de citogenética y de la biología molecular que detectan dichas aberraciones es posible diagnosticar la entidad de manera inequívoca y estudiar la enfermedad mínima residual.

**Objetivo:** Describir, comparar y analizar las técnicas de citogenética y de la biología molecular que son útiles para el diagnóstico y el seguimiento del paciente con leucemia promielocítica. Así como señalar sus ventajas y limitaciones.

**Métodos:** Se realizó revisión de la bibliografía científica de los últimos cinco años relacionada con el tema a través de PUBMED. Se realizó análisis y resumen de la información.

**Análisis y síntesis de la información:** Se describen dos técnicas de citogenética y tres moleculares basadas en la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa. Se comparan y analizan sus ventajas y limitaciones.

**Conclusiones:** Algunas de estas técnicas son útiles únicamente para el diagnóstico, mientras que otras, por su alta sensibilidad, se recomiendan para el seguimiento del paciente con leucemia promielocítica.

**Palabras clave:** leucemia promielocítica; técnicas de citogenética; reacción en cadena de la polimerasa.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Promyelocytic leukemia (PML) is a subtype of acute myeloid leukemia that frequently presents with a potentially fatal coagulopathy, therefore it represents a medical emergency. In the vast majority of patients, the t (15; 17) (q24; q21) occurs, which generates the aberrant gene PML-RARA. Using different cytogenetic and molecular biology techniques that detect these aberrations, it is possible to unequivocally diagnose the entity and study minimal residual disease.

**Objective:** To describe, compare and analyze cytogenetics and molecular biology techniques that are useful for diagnosis and follow-up of the patient with Promyelocytic leukemia. As well as pointing out its advantages and limitations.

**Methods:** A review of the scientific bibliography of the last five years related to the subject was carried out through PUBMED. An analysis and summary of the information was made.

**Analysis and synthesis of the information:** Two cytogenetic and three molecular techniques are described based on the application of the polymerase chain reaction. Its advantages and limitations are compared and analyzed.

**Conclusions:** Some of these techniques are only useful for diagnosis, while others, due to their high sensitivity, are recommended for monitoring the patient with Promyelocytic leukemia.

**Keywords:** promyelocytic leukemia; cytogenetic techniques; polymerase chain reaction

Recibido: 03/11/2020

Aceptado: 22/04/2021

## Introducción

La leucemia promielocítica (LPM) es un subtipo de leucemia mieloide aguda (LMA) que representa entre el 10 y el 15 % de todos los casos de LMA. Al diagnóstico se presenta frecuentemente con una coagulopatía potencialmente mortal; lo cual la convierte en una emergencia médica.<sup>(1)</sup> Las guías internacionales recomiendan que ante la sospecha de LPM se inicien rápidamente el tratamiento y los cuidados propios de la entidad, mientras se espera por la confirmación del diagnóstico.<sup>(2)</sup>

El estudio citomorfológico de la médula ósea revela fundamentalmente la presencia de promielocitos en gran cantidad, lo que la distingue del resto de las LMA. El exceso de promielocitos se acumula en la médula ósea, aunque pueden observarse en ocasiones en periferia. Los signos, síntomas y complicaciones de la leucemia promielocítica se generan por la producción excesiva de promielocitos y la producción insuficiente de células sanguíneas maduras. Sin embargo, en ocasiones la presentación puede ser compleja y conllevar a una clasificación errónea basada en las características citomorfológicas.<sup>(3)</sup>

Las técnicas moleculares y citogenéticas representan un profundo cambio para el diagnóstico y el abordaje terapéutico de las leucemias agudas. Durante las últimas tres décadas, los criterios de diagnóstico y seguimiento han evolucionado desde la simple evaluación de las características morfológicas hacia la determinación de aberraciones cromosómicas y moleculares con métodos cada vez más sensibles y certeros.<sup>(4)</sup> Por esto, desde el año 2002 y hasta la actualización del 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS), además de las características citomorfológicas y citoquímicas en la clasificación de las leucemias mieloides agudas, ha incorporado progresivamente las alteraciones moleculares y citogenéticas que pueden catalogarse como propias de una entidad particular;<sup>(5)</sup> tal es el caso de la LPM.

El objetivo de la presente revisión es describir, comparar y analizar las técnicas de citogenética y de la biología molecular que son útiles para el diagnóstico y el seguimiento del paciente con leucemia promielocítica. Así como señalar sus ventajas y limitaciones”.

## Métodos

Se realizó una revisión de la bibliografía científica de los últimos cinco años relacionada con el tema a través de PUBMED. Se utilizaron como palabras clave: técnicas de diagnóstico citogenético, técnicas de diagnóstico molecular, leucemia promielocítica, tipos de reacción en cadena de la polimerasa ventajas y desventajas, estudio de la enfermedad mínima residual de la leucemia promielocítica. Se hizo un análisis y resumen de la bibliografía y se tomaron los aspectos referidos al tema que permitieron cumplimentar el objetivo.

## Análisis y síntesis de la información

En la gran mayoría de los pacientes con LPM (~ 98 %) ocurre la t(15;17)(q24;q21) que involucra al gen de la leucemia promielocítica (PML por sus siglas en inglés) situado en el cromosoma 15 (15q24) y al gen del receptor alfa del ácido retinoico (RARA por sus siglas en inglés) localizado en el cromosoma 17 (17q21). Esta fusión genera un gen aberrante denominado PML-RARA. El cual, a través de puntos de corte en el intrón 2 del gen RARA y el intrón 6, el intrón 3 y el exón 6 del PML, da lugar a las isoformas: larga (bcr1), corta (bcr3) y variable (bcr2), del gen de fusión PML-RARA que representan el 55 %, 40 % y 5 % de todos los casos, respectivamente.<sup>(6)</sup>

La identificación de la alteración genética específica de la LPM se puede realizar mediante cariotipo convencional, hibridación in situ por fluorescencia (FISH) y la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cualitativa o la cuantitativa en tiempo real (RT-PCR o RQ-PCR, por sus siglas en inglés, respectivamente).

El análisis de la tinción nuclear de PML en células leucémicas con anticuerpos monoclonales anti-PML también puede ser utilizado para el diagnóstico. Todas son igualmente específicas, pero no poseen la misma sensibilidad. Mientras que la citogenética convencional es más propensa a falsos negativos por su baja sensibilidad; el FISH y la inmunotinción con anticuerpos monoclonales anti-PML son más rápidos y altamente sensibles y específicos. Sin embargo, la tinción nuclear de PML se basa en una interpretación subjetiva y, a menos que sea realizado por examinadores

experimentados, será menos reproducible. Ninguno de los métodos pueden sustituir a la RT-PCR y la RQ-PCR que se deben ejecutar siempre en paralelo.<sup>(7)</sup> La RT-PCR constituye la regla de oro para la confirmación genética de la LPM, puesto que es la única que permite la identificación de las isoformas del gen de fusión PML-RARA.<sup>(8)</sup> La RQ-PCR por ser cuantitativa y altamente sensible, permite la evaluación de la respuesta durante la terapia, el monitoreo de la enfermedad mínima residual y la detección temprana de una recaída molecular.<sup>(2,7)</sup>

Se han encontrado otros rearrreglos cromosómicos que involucran tanto al gen RARA, como a los genes beta y gamma del receptor del ácido retinoico, RARB y RARG respectivamente. En conjunto se han reportado al menos 17 y son muy poco frecuentes.<sup>(9)</sup> Aunque el gen PML-RARA no aparece en el 100 % de los casos, el diagnóstico estandarizado e implementado como rutina se basa en su detección. El total del resto de transcritos puede aparecer en alrededor del 2 % de los pacientes lo que hace difícil el diseño de una PCR específica para cada uno de ellos, al menos para aplicarlo como análisis de rutina. En laboratorios donde es posible secuenciar, ha sido posible personalizar el estudio molecular mediante la amplificación con cebadores diseñados para rupturas atípicas del PML-RARA que no mostraron amplificación con la PCR convencional.<sup>(10)</sup> Esto permite la rápida iniciación del tratamiento específico y el monitoreo de la EMR por RQ-PCR pero la tecnología para realizarlo no está al alcance de la mayoría de laboratorios.

Para el momento del diagnóstico, la citogenética convencional, el FISH y el estudio molecular mediante la PCR constituyen técnicas precisas. Cada una de ellas con diferente nivel de sensibilidad. Al inicio de la enfermedad predomina el clon celular portador de la aberración causante de la enfermedad por lo que la sensibilidad en este momento no es limitante. Sin embargo, para evaluar la existencia residual de células portadoras de la aberración, es preciso utilizar las técnicas más sensibles. El presente artículo se propone revisar mediante qué técnicas de citogenética y de la biología molecular, se realiza el diagnóstico y seguimiento de la LPM en la actualidad. Así como señalar sus ventajas y limitaciones.

## Técnicas de citogenética

La citogenética convencional se basa en la observación del cariotipo por bandeo G y desempeña un papel importante en el estudio de las anomalías cromosómicas. Existen dos formas: directamente a través de un microscopio, en cuyo caso el resultado depende mucho de la pericia del observador, o con una cámara que capta la imagen y un software que la procesa y facilita su análisis. Sin embargo, sólo es posible examinar aquellas células que se encuentren en metafase ya que es preciso que los cromosomas sean visibles. Esto último, resta sensibilidad ya que el examen queda limitado al número de metafases que resultaron expuestas. Con esta técnica con frecuencia se reportan falsos negativos por lo que no debe utilizarse como única herramienta de diagnóstico en la LPM.<sup>(11)</sup> Por otra parte, su baja sensibilidad no permite emplearla para el estudio de la EMR.

La técnica de citogenética conocida como FISH, ha demostrado ser más sensible que la convencional. Aunque estudia aberraciones del cariotipo, su fundamento es molecular. La técnica detecta secuencias de ADN, en células o tejidos preservados, mediante el empleo de una sonda (fragmento de ADN homólogo a la secuencia blanco) marcada con un fluorocromo. La sonda va dirigida hacia el lugar específico del ADN para el que fue diseñado y al hibridar emite fluorescencia que puede ser observada a través de un microscopio de fluorescencia sin necesidad de que la célula se encuentre en metafase. Por tanto, quedan marcadas las células que posean la secuencia de nucleótidos correspondiente, las cuales pueden ser cuantificadas. La técnica también permite identificar patrones atípicos, aunque con frecuencia algunos son pasados por alto y son reportados como falsos negativos. Por esta razón, no se puede confiar únicamente en el FISH para el diagnóstico de la LPM.<sup>(12)</sup> Además, la técnica brinda la posibilidad de detectar otros patrones que involucren al cromosoma 17.

A través del FISH, es posible detectar un mayor número de células portadoras de la aberración cromosómica respecto a la citogenética convencional; lo que representa un nivel de sensibilidad más alto al momento de estudiar la EMR. Sin embargo, a pesar de ser más sensible que la citogenética convencional, la PCR ha demostrado que aún puede quedar una determinada cantidad de células sin ser detectadas por FISH.<sup>(13)</sup>

## La reacción en cadena de la polimerasa

Desde su invención, la técnica de PCR ha evolucionado conforme la tecnología ha avanzado. A pesar de que cada nueva técnica de PCR ha superado alguna limitación o desventaja de la anterior, todas conservan su valor. Para el diagnóstico y seguimiento de la LPM se ha generalizado el uso de la PCR cualitativa o de punto final y la PCR cuantitativa o en tiempo real (RQ-PCR). Más recientemente, la PCR digital (dPCR) comienza a introducirse en este campo.<sup>(14)</sup>

La PCR es una reacción enzimática que da lugar a la formación de millones de copia de un fragmento de ADN, a partir de una muestra molde, bajo la acción catalizadora de una ADN polimerasa. La invención de esta técnica, que le valió el premio Nobel de Química en 1993 a Kary Mullis,<sup>(15)</sup> ha convertido a la biología molecular en una herramienta indispensable para el diagnóstico clínico, entre otras muchas aplicaciones en diferentes ramas de la ciencia. La reacción, que pudo ser automatizada gracias al empleo de una ADN polimerasa termoestable, la Taq ADN polimerasa,<sup>(16)</sup> consta de ciclos sucesivos de tres pasos que ocurren, cada uno, a diferente temperatura. El diseño de la reacción permite seleccionar, mediante los llamados cebadores, la zona del ADN que interesa la cual quedará duplicada al finalizar cada ciclo. La repetición sucesiva del ciclo, 30 a 40 veces, conlleva a la amplificación exponencial del número de copias, en el orden de millones o billones, razón por la cual la técnica tiene tan alta sensibilidad.

En los años 90 fueron iniciados los estudios moleculares del gen de fusión PML-RARA mediante la PCR, que al utilizar ácido ribonucleico (ARN) como material genético de partida requiere previamente de una reacción de transcripción inversa para obtener ADN complementario.<sup>(8)</sup> A esta variante de PCR que incluye la transcripción inversa se le denomina RT-PCR por sus siglas en inglés.

Con la forma convencional de PCR, catalogada también como de punto final, el análisis del producto se realiza al finalizar la reacción mediante electroforesis, con el uso de diferentes tipos de geles según el caso; lo cual permite la apreciación cualitativa del fragmento amplificado. En paralelo con el producto de la PCR se corre en la electroforesis un marcador de pesos moleculares (MPM) que no es más que una mezcla

de fragmentos de ADN de tamaños conocidos y por comparación se chequea si el peso molecular (PM) del producto corresponde al esperado. Sin embargo, es posible que ocurra una amplificación inespecífica que arroje un PM similar. Para descartar una amplificación inespecífica lo ideal es aislar la banda que aparece en el gel, purificar el producto y secuenciarlo. Sin embargo, al menos por ahora, este proceso es caro y demorado, por lo cual no es posible implementarlo como análisis de rutina para el diagnóstico clínico. Para minimizar la posibilidad de un falso positivo, el protocolo de referencia, Biomed-1, incluye el diseño de una PCR de comprobación, conocida en inglés como “*shifted*”, que se realiza cuando resulta positiva la PCR de diagnóstico. La PCR “*shifted*” minimiza la posibilidad de falsos positivos y consiste en cambiar la pareja de cebadores de manera que se unan a una región más proximal el uno y más distal el otro del punto de unión entre los genes PML y RARA.<sup>(8)</sup> Si con este cambio de cebadores se observa amplificación nuevamente, existe una alta probabilidad de que ésta sea específica, en este caso del gen de fusión PML-RARA.

Para la detección de cada una de las isoformas en que puede presentarse el gen de fusión PML-RARA, bcr1, bcr2 y bcr3, es preciso realizar más de una reacción según el protocolo conocido como Biomed-1.<sup>(8)</sup> Éste es el más generalizado como PCR de punto final para la detección de transcritos en las leucemias agudas y no ha perdido su vigencia como herramienta para el diagnóstico y seguimiento de la LPM. Para la amplificación de las tres isoformas los autores diseñaron dos PCR; una que abarca la región de unión bcr1 y bcr2, por encontrarse cercanas, y otra que reproduce la región de unión bcr3.

Una variante de PCR, la anidada o “*nested*” (nPCR), como se le conoce en inglés, aumenta considerablemente la sensibilidad. El protocolo mencionado también incluyó el diseño de esta variante para el estudio evolutivo del PML-RARA. Se trata de realizar una segunda amplificación, a partir del producto de la primera, con un par de cebadores diferentes e internos respecto a los primeros.<sup>(8)</sup> La sensibilidad que se alcanza con una PCR cualitativa simple es de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ , mientras que con la nPCR la sensibilidad se incrementa al rango de  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$ .<sup>(8)</sup> A pesar del incremento de la sensibilidad con esta variante, persiste el inconveniente de ser cualitativa y hasta

observar un resultado negativo, no será posible reportar una respuesta favorable al tratamiento a nivel molecular.

La RT-PCR es una importante herramienta para el diagnóstico, pero brinda un resultado cualitativo (positivo o negativo) que es sólo informativo del estatus de la enfermedad. Por ende, no proporciona la cuantificación, que sería una medida de la expresión génica; ni el comportamiento cinético, aumento o disminución, durante el tratamiento. A pesar de su alto nivel de sensibilidad, sobre todo de la nPCR, la imposibilidad de cuantificar es una desventaja que la hace menos útil para el conocimiento objetivo del comportamiento de la EMR en los pacientes con LPM.

### PCR cuantitativa o en tiempo real

La RQ-PCR fue introducida por el doctor en biología molecular *Russell Higuchi* y su equipo de investigación en 1992.<sup>(17)</sup> A diferencia de la PCR de punto final, la RQ-PCR puede determinar *cuánto de una secuencia específica de ADN existe en una muestra, en lugar de simplemente identificar su presencia.*

Mediante la inclusión de sondas específicas marcadas con fluorocromos, una fuente de excitación y un detector de fluorescencia acoplados al termociclador, se puede monitorear el progreso en tiempo real de la reacción de amplificación. El equipo mide la fluorescencia que se produce con la liberación del fluoróforo cada vez que se completa una copia. El incremento de lectura es proporcional a la cantidad de fragmentos de ADN generados y la multiplicación de estos, que crece exponencialmente, es proporcional al número inicial presente en la muestra. Al finalizar la reacción, el producto es cuantificado y analizado mediante “*software*” acoplado al equipo. De esta manera, son superados dos inconvenientes de la PCR de punto final: el no poder cuantificar y la necesidad del análisis posterior que además de consumir tiempo incrementa la posibilidad de contaminación.<sup>(17)</sup>

Se debe tener en cuenta que la cuantificación se obtiene por extrapolación en una curva construida con estándares amplificados en paralelo, lo que puede introducir variaciones entre experimentos y laboratorios. Además, es relativa porque se calcula

el número de copias normalizado (NCN) tomando como referencia el número de copias de un gen control que se amplifica en paralelo.<sup>(7)</sup>

La detección por fluorescencia en la RQ-PCR tiene mayor sensibilidad que una electroforesis por lo que es frecuente observar una muestra negativa por PCR cualitativa que resulta positiva por RQ-PCR. Sin embargo, debido al incremento de sensibilidad de la nPCRy a fin de detectar la EMR con la mayor sensibilidad posible es recomendable amplificar en paralelo mediante la nPCR y la RQ-PCR para minimizar la ocurrencia de falsos negativos.

*Liu* y otros, establecieron un criterio de respuesta molecular menor y mayor mediante RQ-PCR y su aplicación ha probado ser factible y tener relevancia clínica. El alcance y mantenimiento de una respuesta molecular mayor está asociada a una remisión clínica constante y la pérdida de dicha condición indica un incremento del riesgo de progresión de la enfermedad.<sup>(18)</sup>

En la leucemia promielocítica, el estudio previo o inicial por PCR cualitativa es importante para la identificación de la isoforma. La RQ-PCR se ha diseñado de tal manera que amplifica cada isoforma por separado y en aras de no amplificarlas una tras otra hasta encontrar si alguna de ellas está presente, es recomendable conocer este dato con anterioridad. Recientemente se ha demostrado que el NCN del transcrito PML-RARA al momento del diagnóstico no tiene significado pronóstico,<sup>(19)</sup> lo cual evidencia que la cuantificación no es indispensable al inicio de la LPM.

La RQ-PCR, aunque tiene limitaciones, supera los métodos previos al brindar la posibilidad de cuantificar de manera sensible por lo que su uso es recomendable para el estudio de la EMR. Además, la amplificación en paralelo del gen en estudio junto con un gen control, evita los resultados falsos negativos que pueden deberse a una amplificación deficiente durante la PCR.<sup>(20)</sup>

Una desventaja es que la cuantificación es relativa y esto implica que pueden ocurrir variaciones entre experimentos y laboratorios debido a variaciones en la eficiencia y el uso de estándares diferentes, entre otras causas.<sup>(21)</sup>

Por lo explicado, al menos en el caso de la LPM y la detección del gen de fusión PML-RARA, la RQ-PCR no sustituye a la PCR cualitativa sino que una y otra se complementan.<sup>(7)</sup>

### PCR digital

El diseño de esta nueva técnica, bautizada como PCR de 3<sup>ra</sup> generación, permite la cuantificación absoluta de ácidos nucleicos. La técnica es particularmente útil para detectar cantidades muy pequeñas del fragmento objeto de estudio; lo que la hace altamente sensible para la detección de la EMR. Se estima que la PCR digital (dPCR) puede detectar una secuencia presente hasta en un 0,001 %.<sup>(22)</sup> La dPCR combina las dos generaciones de PCR precedentes, ya que es una PCR de punto final con cuantificación posterior por fluorescencia.

Previo a la amplificación y en un equipo especializado, la mezcla se somete a un proceso de fragmentación en presencia de aceite, que da lugar a la formación de una emulsión. La mezcla junto con el ADN molde queda fraccionada en nanogotas o burbujas, cada una de las cuales contendrá una o ninguna molécula de ácido nucleico. Después de la amplificación, los ácidos nucleicos pueden cuantificarse por fluorescencia en un equipo que cuenta una a una las nanoburbujas y realiza la cuantificación absoluta del producto de PCR.<sup>(22)</sup>

La dPCR puede superar algunas dificultades que presentan la PCR convencional de punto final y la RQ-PCR. En la PCR convencional, el número de copias inicial es proporcional al número de ciclos de amplificación. Sin embargo, la dPCR no depende del número de ciclos de amplificación para determinar la cantidad de muestra inicial, lo que elimina la dependencia de datos exponenciales inciertos para cuantificar los ácidos nucleicos diana y proporciona una cuantificación absoluta que no requiere de una curva estándar como en el caso de la RQ-PCR.<sup>(21,22)</sup>

Las principales desventajas de la dPCR son el costo del análisis, la disponibilidad limitada de los instrumentos que aún no se generalizan en laboratorios de diagnóstico y la falta de estandarización.<sup>(22)</sup>

Han sido publicados pocos estudios sobre la EMR en la LPM con el uso de la dPCR. *Brunetti* y otros,<sup>(23)</sup> en estudio comparativo entre la nPCR, la RQ-PCR y la dPCR, encontraron que la dPCR tuvo una sensibilidad y especificidad del 95 % o más y del 91 % o más, respectivamente, para los transcritos bcr1 y bcr3. De hecho, tuvo una concordancia significativa con ambos métodos, particularmente con la nPCR. La principal ventaja de la dPCR para el monitoreo de la EMR es precisamente la cuantificación absoluta. Los mismos autores encontraron que la dPCR hizo posible cuantificar la EMR en pacientes que por RQ-PCR mostraban niveles inferiores al límite de detección de ésta y que por nPCR era detectada, pero sin la posibilidad de ser cuantificada. De esta manera la dPCR provee una información crucial para el manejo de los pacientes donde existen aún células del clon leucémico. Esto resalta la utilidad de la dPCR para monitorear la EMR particularmente en aquellos pacientes con alto riesgo de recaída.<sup>(23)</sup>

En resumen, la identificación de la t(15;17)(q24;q22) mediante citogenética o del gen de fusión PML-RARA mediante PCR es indispensable para el diagnóstico certero de la LPM en más del 95 % de los casos. En cambio, para el estudio de la EMR donde se requiere de alta sensibilidad, se recomienda el estudio molecular por PCR. Las diferentes formas de PCR descritas aquí no son excluyentes y cada una tiene sus ventajas y limitaciones. La PCR convencional de punto final con análisis cualitativo, si bien al inicio de la enfermedad no se requiere alta sensibilidad, para el seguimiento se recomienda en su variante de nPCR por el incremento de sensibilidad que representa. En la RQ-PCR su detección por fluorescencia es más sensible que el análisis por electroforesis de la primera y tiene la ventaja de que permite cuantificar pero lo hace por extrapolación y de manera relativa. Por último, la PCR de 3<sup>ra</sup> generación, la dPCR, es la más sensible de las tres y en ella la cuantificación es absoluta. Esta última es la mejor opción para el caso de la LPM pero por su alto costo no está al alcance de la mayoría de laboratorios especializados en el diagnóstico molecular.

## Referencias bibliográficas

1. Ryan MM. Acute Promyelocytic Leukemia: A Summary. *J Adv Pract Oncol*. 2018 Mar;9(2):178-87. DOI: <https://10.6004/jadpro.2018.9.2.4>

2. Iaccarino L, Divona M, Ottone T, Cicconi L, Lavorgna S, Ciardi C, et al. Identification and monitoring of atypical PML/RARA fusion transcripts in acute promyelocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019 Jan;58(1):60-5. DOI: <https://10.1002/gcc.22708>
3. Amor AM, Hernández LL, Díaz CA, Fernández L, Ruíz V, Garrote H. La biología molecular en la precisión diagnóstica de las leucemias. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2018;34(3):1-7.
4. De Angelis F, Breccia M. Molecular Monitoring as a Path to Cure Acute Promyelocytic Leukemia. *Rare Cancers Ther*. 2015 Oct;3:119-32. DOI: <https://10.1007/s40487-015-0013-8>
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May;127(20):2391-405. DOI: <https://10.1182/blood-2016-03-643544>
6. Lo-Coco F, Ammatuna E. The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2006;156-61:514.
7. Sanz MA, Fenaux P, Tallman MS, Estey EH, Löwenberg B, Naoe T, et al. Management of Acute Promyelocytic Leukemia: Updated Recommendations from an Expert Panel of the European Leukemia Net. *Blood*. 2019 Apr; 133(15):1630-43
8. 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. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999 Dec;13(12):1901-28. DOI: <https://10.1038/sj.leu.2401592>
9. Wen L, Xu Y, Yao L, Wang N, Wang Q, Liu T, et al. Clinical and molecular features of acute promyelocytic leukemia with variant retinoid acid receptor fusions. *Haematologica* 2019 May; 104(5):e195-e199. DOI: <https://10.3324/haematol.2018.205369>
10. Iaccarino L, Ottone M, Cicconi T, Lavorgna L, Ciardi S, Alfonso C, et al. Identification and monitoring of atypical PML/RARA fusion transcripts in acute promyelocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019 Jan;58(1):60-5. DOI: <https://10.1002/gcc.22708>

11. King RL, Naghashpour M, Watt CD, Morrissette JJD, Bagg A. A Comparative Analysis of Molecular Genetic and Conventional Cytogenetic Detection of Diagnostically Important Translocations in more than 400 Cases of Acute Leukemia, Highlighting the Frequency of False-Negative Conventional Cytogenetics. *Am J Clin Pathol* 2011;135:921-8. DOI: <https://10.1309/AJCPJCW6BYOCNIHD>
12. Wan TSK, So CC, Hui KC, Yip SF, Ma ESK, Chan LC. Diagnostic utility of dual fusion PML/RAR $\alpha$  translocation DNA probe (D-FISH) in acute promyelocytic leukemia. *Oncol Rep.* 2007 Apr; 17:799-805. DOI: <https://10.3892/or.17.4.799>
13. Polampalli S, Choughule A, Prabhash K, Amare P, Baisane C, Kabre S, et al. Role of RT-PCR and FISH in diagnosis and monitoring of acute promyelocytic leukemia. *Indian J Cancer*, 2011 Jan-Mar;48(1):60-7. DOI: <https://10.4103/0019-509X.75831>
14. Cocco N, Tota G, Anelli L, Zagaria A, Specchia G, Albano F. Digital PCR: A Reliable Tool for Analyzing and Monitoring Hematologic Malignancies. *Int. J Mol Sci.* 2020 Apr;21(9):3141. DOI: <https://10.3390/ijms21093141>
15. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51:263-73
16. Holland P, Abramson R, Watson R, Gelfand D. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-----3' exonuclease activity of *Thermusaquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:7276-80
17. Higuchi R, Dollinger G, Walsh S, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific of DNA sequences. *Bio/Technol.* 1992 May; 10(4):413-7. DOI: 10.1038/nbt0492-413
18. Liu YF, ZhuYM, ShenSH, ShenZX, LiJM, ChenSJ, et al. Molecular response in acute promyelocytic leukemia: a direct comparison of regular and real-time RT-PCR. *Leukemia.* 2006 May;20:1393-9. DOI: <https://10.1038/sj.leu.2404262>
19. Rasekh EO, Elsayed GM, Fathy S. No prognostic significance of normalized copy number of PML-RARA transcript at diagnosis in patients with acute promyelocytic leukemia. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*(2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2020.07.002>
20. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, Bi W, DeeR, van der SchootE, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase

chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*.

2003;17(12):2474-86. DOI: <https://10.1038/sj.leu.2403136>

21. Yuan D, Cui M, Yu S, Wang H, Jing R. Droplet digital PCR for quantification of PML-RAR $\alpha$  in acute promyelocytic leukemia: a comprehensive comparison with real-time PCR. *Anal Bioanal Chem*. 2019 Feb;411(4):895-903. DOI:

<https://10.1007/s00216-018-1508-6>

22. Andreani G, Cilloni D. Strategies for minimal residual disease detection: current perspectives. *Blood Lymphat Cancer*. 2019 Feb;12(9):1-8. DOI:

<https://doi.org/10.2147/BLCTT.S172693>

23. Brunetti C, Anelli L, Zagaria A, Minervini A, Minervini CF, Casieri P, et al. Droplet Digital PCR Is a Reliable Tool for Monitoring Minimal Residual Disease in Acute Promyelocytic Leukemia. *J Mol Diagn*. 2017 May; 19(3):437-44. DOI:

<https://10.1016/j.jmoldx.2017.01.004>

### **Conflicto de intereses**

Los autores no declaran conflicto de intereses.

### **Contribuciones de los autores**

*Ana María Amor Vigil*: Concepción del trabajo, discusión, escritura, revisión, corrección y aprobación de la versión final del artículo.

*Kalia Lavaut Sánchez*: Participó en la discusión, escritura, revisión y aprobación de la versión final del artículo.

*Carmen Alina Díaz Alonso*: Participó en la discusión, escritura y aprobación de la versión final del artículo.