

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas



**“DESARROLLO DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO
MOLECULAR DE ENFERMEDADES
ONCOHEMATOLÓGICAS”**

Leonardo Fabián Prone

Tesina para optar al título de Licenciado en Biotecnología

Directores:

Dr. Enrique Detarsio

Dr. Jorge Saslavsky

- Centro de Hematología -

Rosario, 2018

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por apoyarme siempre durante tantos años de carrera. A Pucho (“El perro más bueno del mundo”), por sus casi 13 años a mi lado. A Daniel Heredia, quien, sin su ayuda, tal vez, no podría haber tenido un estudio universitario. A mis amigos de toda la vida, a los que conocí en esta facultad y a los nuevos, por estimularme, todos, a seguir y terminar la carrera. A mis maestros y profesores que me dieron herramientas para llegar a la universidad y poder desenvolverme bien en ésta. A mi director Enrique Detarsio, por guiarme y formarme en esta Tesina. Al Dr. Jorge Saslavsky, por permitirme llevar a cabo este trabajo en su laboratorio y por su afecto y actitud siempre a favor de la investigación. Al personal docente de esta facultad, siempre pensando en el bien del alumno, actitud no tan común en otros niveles educativos. Al personal no docente, siempre bien dispuesto a ayudarme desde hace varios años. A Alicia Dominguez, por colaborar fuertemente este año en favor de mi caso y al Consejo Directivo, por darme la oportunidad de terminar mi carrera.

ÍNDICE GENERAL

	<i>Página</i>
RESUMEN	<i>vi</i>
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	2
1.1.1. Bases genéticas de la LMC	3
1.1.2. Terapéutica	4
1.1.3. Monitoreo de la LMC	5
1.1.4. Cuantificación de transcritos <i>BCR-ABL1</i> en pacientes con LMC mediante <i>RT-PCR cuantitativa</i>	6
1.1.4.1. <i>Estimación del número de copias de transcritos <i>BCR-ABL1</i> y <i>ABL1</i> (gen de referencia)</i>	6
1.2. OBJETIVOS	7
1.2.1. Objetivo general	7
1.2.2. Objetivos específicos	7

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1. PREPARACIÓN DE AGUA CON DEPC	10
2.2. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE GLÓBULOS BLANCOS	10
2.3. AMPLIFICACIÓN DE MOLÉCULAS DE ARN MEDIANTE <i>RT-PCR</i>	12
2.3.1. Detección de transcritos <i>BCR-ABL1</i> mediante <i>RT-PCR</i> anidada	13
2.3.1.1. <i>DETECCIÓN DE TRANSCRIPTOS BCR-ABL1 p190 e1-a2</i>	13
2.3.1.2. <i>DETECCIÓN DE TRANSCRIPTOS BCR-ABL1 p210 b3-a2</i> <i>y p210 b2-a2</i>	14
2.3.2. Generación de moléculas controles positivos <i>BCR-ABL1</i> mediante <i>PCR</i>	14
2.3.3. Detección del transcrito <i>ABL1</i> y generación del <i>Control Positivo ABL1</i> mediante <i>RT-PCR</i>	15
2.4. GENERACIÓN DE MOLÉCULAS COMPETIDORAS MEDIANTE <i>PCR</i>	15
2.4.1. Competidores <i>BCR-ABL1</i>	15
II.4.1.1. <i>Generación del Competidor p190 e1-a2</i>	16
II.4.1.2. <i>Generación de Competidores p210 b3-a2 y p210 b2-a2</i>	16
2.4.2. Generación del <i>Competidor ABL1</i> mediante <i>PCR</i>	16
2.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	17
2.6. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS	17
2.7. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	17
2.8. LIGACIÓN DE PRODUCTOS DE <i>PCR</i> Y TRANSFORMACIÓN	17
2.8.1. Ligación	17
2.8.2. Transformación de células competentes de <i>E.coli</i> DH5a	19
2.9. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS	19
 CAPÍTULO 3: COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES	 21

4.5.3. Chequeo de amplificaciones y clonado para generar moléculas competidoras	44
4.5.3.1. <i>Competidor p190 e1-a2</i>	44
4.5.3.2. <i>Competidor p210 b3-a2</i>	45
4.5.3.3. <i>Competidor p210 b2-a2</i>	45
4.5.3.4. <i>Competidor ABL1</i>	46
4.5.4. Resumen de resultados de clonado de competidores	47
4.6. CHEQUEO DE TODOS LOS CLONES PURIFICADOS	47
4.7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	48
CAPÍTULO 5: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

RESUMEN

La translocación *BCR-ABL1*, t(9;22), también llamada *cromosoma Filadelfia* (Ph), se encuentra en el 95 % de casos de leucemia mieloide crónica (LMC), en aproximadamente el 25 % de los casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) en adultos, y en el 5 % de los casos de esta última enfermedad en niños (1).

La detección molecular por *RT-PCR* de la presencia de transcritos *BCR-ABL1* es la técnica más sensible de detección de células portadoras de dicha translocación. Su cuantificación mediante *RT-PCR cuantitativa* tiene valor pronóstico sobre la evolución de ambos tipos de leucemia (2,3,4,5,6).

En el presente trabajo se propuso implementar un protocolo de detección de transcritos *BCR-ABL1* mediante *RT-PCR anidada* y su cuantificación utilizando la técnica de “*RT-PCR anidada competitiva*”.

En primer lugar se implementó un protocolo de detección de los distintos tipos de transcritos *BCR-ABL1*. Luego, con el fin de determinar su sensibilidad y precisión, se intentaron clonar moléculas *controles positivos* en un vector plasmídico con éxito parcial. También, se diseñaron primers para la construcción de moléculas de ADN “competidoras”. Se lograron generar dichas moléculas mediante *RT-PCR*, luego de lo cual se intentaron clonar con resultados parcialmente exitosos.

En resumen, se generaron parte de los elementos necesarios para implementar un sistema de detección y cuantificación de transcritos *BCR-ABL1*, t(9;22).

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Las neoplasias hematológicas presentan generalmente alteraciones cromosómicas, muchas de las cuales han sido asociadas a las características de cada patología. La translocación t(9;22), también llamada *cromosoma Filadelfia* (Ph), fue la primera en asociarse a leucemias. Esta translocación se encuentra presente en más del 95% de los casos de leucemia mieloide crónica (LMC), en aproximadamente el 25% de los casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) en adultos, y en el 5% de los casos de esta última enfermedad en niños (1). Como resultado de dicha alteración cromosómica, se genera un gen de fusión llamado *BCR-ABL1* (véase figura 1.1).

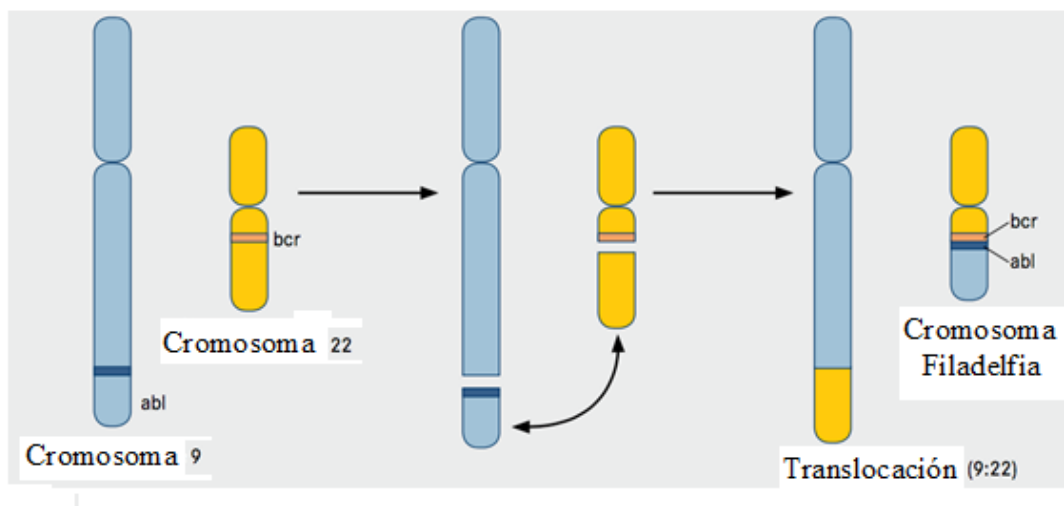


Figura 1.1. Cromosoma Filadelfia (Ph).

La presencia de células portadoras de la translocación *BCR-ABL1* puede evaluarse mediante análisis citogenético, inmunofluorescencia in situ (*FISH*), Southern Blot, Western Blot o mediante transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (*RT-PCR*) (7).

En unos pocos pacientes (aproximadamente 5%) con LMC, el cromosoma Ph no es detectable mediante análisis citogenético convencional, a pesar de la positividad *BCR-ABL1* por *FISH* o *RT-PCR*. La explicación para estos casos es que existiría un doble evento de recombinación que involucra los cromosomas 9 y 22, y en algunos casos uno o más cromosomas diferentes. Usualmente, pacientes con LMC, con Ph negativo/*BCR-ABL1* positivo, son clínicamente indistinguibles de aquellos pacientes con Ph positivo (8).

1.1.1. Bases genéticas de la LMC

Los análisis moleculares han establecido que la translocación Ph siempre resulta en la unión de secuencias 3' del *ABL* proto-oncogen 1 (*ABL1* o *c-ABL*, también conocido por ser el homólogo celular del gen *v-ABL* del virus “Abelson de leucemia” murina) (cromosoma 9), codificante para una tirosina quinasa, con secuencias 5' del gen “región de ruptura” (*BCR*, “breakpoint cluster region”) (cromosoma 22), codificante de una serina/treonina quinasa. De acuerdo al sitio de unión entre ambos genes, estas translocaciones pueden dividirse en aquellas que se producen en el “mayor breakpoint cluster” (M-bcr) o en el “minor breakpoint cluster” (m-bcr) (véase figura 1.2). La variedad de genes de fusión generados, da lugar a una variedad de transcritos correspondientes, y éstos a una variedad de proteínas de fusión que presentan, todas, actividad tirosina quinasa desregulada con efecto neoplásico. La masa molecular de estas proteínas varía entre 190 kDa y 230 kDa, dependiendo del sitio de unión entre ambos genes. La translocación en M-bcr genera una proteína de aproximadamente 210 kDa, llamada $p210^{BCR/ABL1}$, y la translocación en m-bcr, una proteína de aproximadamente 190 kDa, llamada $p190^{BCR/ABL1}$ (1). En la figura I.2 se esquematizan las mencionadas translocaciones.

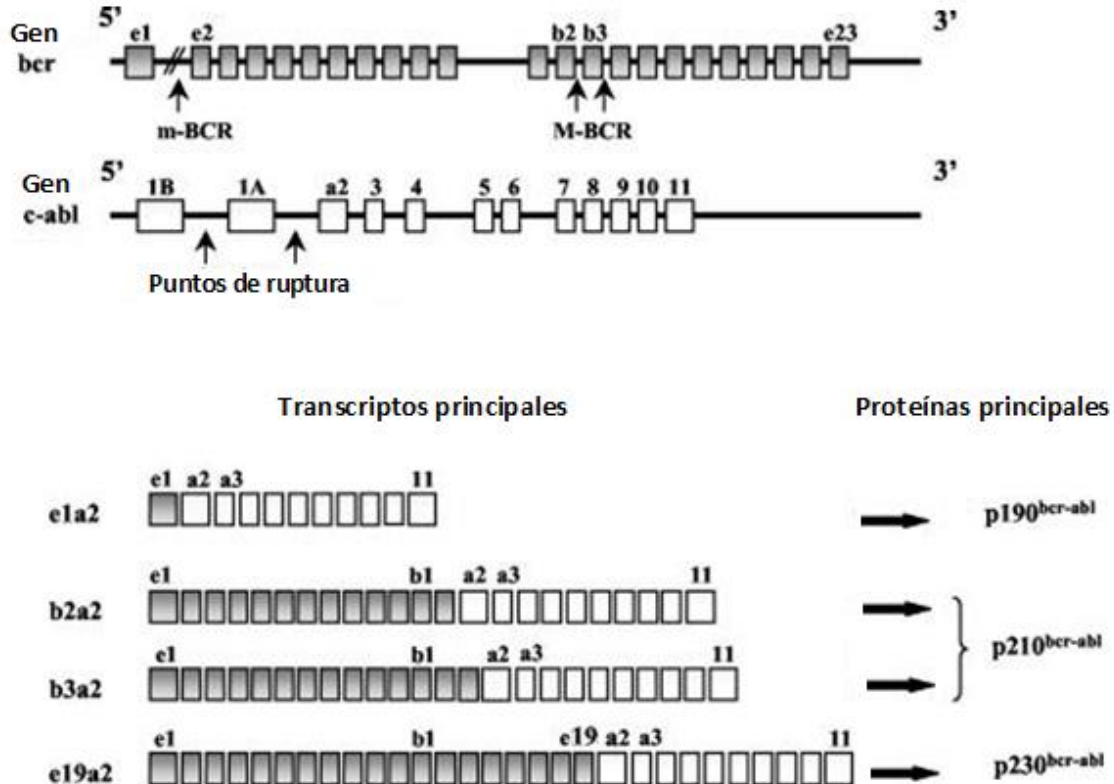


Figura 1.2. Estructura molecular de los genes *BCR* y *ABL1* y sus principales transcritos translocados. Figura modificada de la publicada en (9).

1.1.2. Terapéutica

Existen diversas estrategias terapéuticas para las enfermedades asociadas a la translocación *BCR-ABL1*, que abarcan desde el uso de diversas drogas, tales como interferón, inhibidores específicos de tirosina quinasas (ITKs), hasta trasplante de médula ósea (10).

La eficiencia de la terapia con ITKs puede ser adecuadamente evaluada mediante un monitoreo molecular basado en la cuantificación de los transcritos *BCR-ABL1*, y la

detección de mutaciones de resistencia en el dominio quinasa BCR-ABL1 (11). Estudios recientes reportaron que la administración de larga duración de inhibidores de tirosina quinasas (ITKs) incrementa tanto la carga económica como los efectos adversos del tratamiento, incluyendo eventos vasculares y deterioro de la calidad de vida en pacientes con LMC. Para resolver esos problemas se ha evaluado en varios ensayos clínicos la factibilidad de discontinuar la terapia con ITKs luego de una respuesta molecular completa (RMC) sostenida. Una respuesta molecular completa implica negatividad en el análisis de detección de transcritos de la translocación por *RT-PCR*. Dichos ensayos clínicos han demostrado que alrededor de la mitad de pacientes pudieron mantener RMC luego de discontinuar la terapia con ITKs, lo cual significa una remisión libre de tratamiento (RLT). Así, la RLT es ahora considerada como el próximo objetivo terapéutico de LMC luego de alcanzar la RMC.

En pacientes que alcanzaron la RLT, el sistema inmune podría jugar un rol en controlar la proliferación de células madre leucémicas resistentes a ITKs o manteniendo dichas células en un estado quiescente. Por lo tanto, una inmunoterapia dirigida contra estas células puede ser una estrategia prometedora para alcanzar la RLT (11).

1.1.3. Monitoreo de la LMC

Se ha demostrado que el nivel de células portadoras de la translocación *BCR-ABL1* presentes luego del tratamiento, parámetro denominado “enfermedad residual mínima” (ERM), determinado mediante *RT-PCR cuantitativa*, tiene valor pronóstico sobre la evolución de la enfermedad, tanto en la LMC como en la LLA, y es útil por lo tanto para la toma de decisiones terapéuticas (2, 3, 4, 5 y 6).

1.1.4. Cuantificación de transcritos *BCR-ABL1* en pacientes con LMC mediante *RT-PCR cuantitativa*

Para la cuantificación de transcritos *BCR-ABL1* de una muestra de paciente, mediante *RT-PCR cuantitativa*, debe usarse, además, un *gen control* o *de referencia* apropiado, lo cual permite que el ensayo sea más reproducible y comparable en el tiempo (12,13). El resultado obtenido expresa un valor relativo (no absoluto), que surge del *cociente* entre el número de copias estimado de transcritos *BCR-ABL1* y el número de copias estimado de transcritos del *gen de referencia* (13).

El *gen de referencia* “ideal” para un ensayo *RT-PCR cuantitativo* para *BCR-ABL1* es uno cuyo ARN sea expresado en un nivel similar al del gen *BCR-ABL1*, tenga una cinética de degradación semejante a la del ARN *BCR-ABL1*, no varíe entre tipos celulares o pacientes, y sea estable a través del tiempo y a través del estado de la enfermedad y el tratamiento (12). Los tres *genes de referencia* más estudiados y empleados son *ABL1*, *GUSB* y *BCR*. El uso del gen *ABL1* es recomendable dado que el *nivel de expresión* y *estabilidad* son muy similares al del *BCR-ABL1* (13).

La cuantificación de transcritos *BCR-ABL1* se expresa, entonces, como un *cociente* entre el número estimado de copias de *BCR-ABL1* y el número estimado de copias del *gen de referencia*, *ABL1* (13):

$$(N^{\circ} \text{ copias } BCR-ABL1 / N^{\circ} \text{ copias } ABL1) \cdot 100 = \text{Cociente (\%)} \quad [\text{Fórmula I}]$$

1.1.4.1. Estimación del número de copias de transcritos *BCR-ABL1* y *ABL1* (*gen de referencia*)

Actualmente, la *RT-PCR cuantitativa en tiempo real* (*qRT-PCR*) es la técnica más utilizada para estimar el número de copias de transcritos *BCR-ABL1* y de su *gen de*

referencia ABLI (13). Mediante dicha técnica, se realiza la reacción de transcripción reversa del ARN total de la muestra a analizar, luego de lo cual, se lleva a cabo una reacción de *PCR en tiempo real*, específica para la secuencia de interés. La cuantificación de dicha secuencia se logra al comparar los datos producidos por esta reacción, con datos provenientes de una curva de calibración, generada por *PCR en tiempo real*, en idénticas condiciones, de una dilución seriada de un plásmido conteniendo la secuencia diana.

En el presente trabajo, se propuso abordar la estimación del número de copias de transcritos *BCR-ABL1* mediante la técnica de *RT-PCR anidada competitiva* y la estimación del número de copias de transcritos *ABL1* (*gen de referencia*) mediante *RT-PCR competitiva*, siguiendo los lineamientos presentados en la literatura consultada (1,14,15,16).

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 .Objetivo general

Desarrollar un método de detección y cuantificación de transcritos del gen de fusión *BCR-ABL1*.

1.2.2. Objetivos específicos

- Implementar y optimizar un protocolo de *detección* de transcritos *BCR-ABL1* mediante *PCR anidada*.
- Generar moléculas de ADN “controles positivos” para los distintos tipos de transcritos *BCR-ABL1* y para el transcritos *ABL1*.

- Generar moléculas de ADN “competidoras” para usarse en la cuantificación, por medio de *RT-PCR competitiva*, de cada tipo de transcripto *BCR-ABL1* y de transcriptos *ABL1*.
- Implementar el protocolo de *RT-PCR anidada competitiva* para cuantificación de la relación entre transcriptos *BCR-ABL1* y transcriptos *ABL1*.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. PREPARACIÓN DE AGUA CON DEPC

Un aspecto importante en un procedimiento de extracción de ARN es evitar la contaminación con ribonucleasas (RNAsas), enzimas muy estables que no requieren cofactores para su función. Por lo tanto, se trataron las soluciones y los materiales con Dietilpirocarbonato (DEPC), el cual inactiva las RNAsas por modificación covalente.

Protocolo de preparación: En un tubo eppendorf se mezclaron 600 μ L de agua bidestilada con 600 μ L de DEPC. Se alicuotó en fracciones de 30 μ l en diferentes tubos eppendorf, luego de lo cual se incubó una noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se autoclavó la solución y se almacenó a temperatura ambiente.

2.2. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE GLÓBULOS BLANCOS

Para la extracción de ARN de glóbulos blancos se utilizó el kit SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation). El protocolo consiste básicamente en las siguientes etapas: Se centrifuga la muestra de sangre a 3.000 revoluciones por minuto (“rpm”) por 5 minutos para generar un sobrenadante relativamente claro (aproximadamente 30 % del volumen) y un pellet celular importante (aproximadamente 70 % del volumen). Se elimina el sobrenadante, y se recuperan 300 μ L de la interfase conteniendo glóbulos blancos. A esta suspensión celular luego se agrega 1 mL de Solución de Lisis de Glóbulos Rojos y se resuspende el pellet pipeteando 4-5 veces. Se centrifuga a 3000 rpm por 5 minutos, y se elimina el sobrenadante. Se agregan 175 μ L de Buffer de Lisis RNA al pellet celular, y se pipetea para resuspender el pellet de células. Se agregan luego 350 μ L de

Buffer de Dilución RNA, y se mezcla por inversión 3-4 veces. Luego se coloca la muestra en baño a 70 °C por 3 minutos. A continuación se centrifuga a 12.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se transfiere el lisado clarificado a un tubo estéril. Se agregan 200 µL de etanol 95 % al lisado y se mezcla con pipeta 3-4 veces. Esta mezcla se transfiere a una columna de purificación provista por el kit y colocada sobre un tubo colector, y se centrifuga a 12.000 rpm por un minuto. Se descarta el líquido eluído y se agregan 600 µL de Solución de Lavado de RNA a la columna. Luego se centrifuga 12.000 rpm por 1 minuto. A continuación se agregan a la columna 50 µL de la mezcla de DNasa que contiene 40 µL Yellow Core Buffer, 5 µL de MnCl₂ 0,09 M y 5 µL de enzima DNase I. Se incuba 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregan 200 µL de Solución Stop de DNasa y se centrifuga a 12.000 rpm por 1 minuto. Luego se agregan 600 µL de Solución de Lavado de RNA y se centrifuga a 12.000 rpm por un minuto, se vacía. Se agregan 250 µL de Solución de Lavado de RNA y se centrifuga a 12.000 rpm por un minuto. Luego se transfiere la columna a un tubo de recolección y se agregan 100 µL de agua libre de nucleasas (tratada con DEPC), y se centrifuga a 12.000 rpm por un minuto. El eluído contiene el ARN purificado y se almacena a -20 °C.

Rendimiento y pureza del ARN

El rendimiento de ARN se determinó mediante medidas de absorbancia a 260 nm, y la pureza de la muestra, por medidas a 280 nm. La concentración de ARN se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de ARN } (\mu\text{g ARN/mL}) = \text{Abs } 260 \text{ nm} \cdot 40 \cdot \text{dilución} \text{ [Fórmula II]}$$

*Abs: Absorbancia

La pureza del ARN fue determinada mediante el cálculo de la relación

Abs 260 nm/ Abs 280 nm. Una relación entre 1,8-2 fue considerada una muestra aceptablemente pura.

2.3. AMPLIFICACIÓN DE MOLÉCULAS DE ARN MEDIANTE *RT-PCR*

Transcripción reversa: Se efectuó la reacción de transcripción reversa (*RT*) con hexámeros al azar (random primers). Todos los materiales y muestras utilizados fueron mantenidos en hielo. En un tubo eppendorf, conteniendo una gota de aceite mineral, se mezclaron 0.5 µg de ARN, 1 µL de random primers 125 mM y agua tratada con DEPC en cantidad suficiente para alcanzar 15 µL. Se lo incubó a 65 °C por 5 minutos, y se lo pasó a hielo rápidamente. En otro tubo eppendorf se mezclaron 5 µL de Buffer 5X Transcriptasa Reversa (Promega), 0.7 µL de RNasin (Promega), 0.5 µL de mezcla de dNTP (dTTP 25 mM, dATP 25 mM, dGTP 25 mM, dCTP 25 mM), 1 µL de enzima Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega), y 3 µL de agua tratada con DEPC. Se agregó el contenido de este tubo eppendorf al primer tubo y se efectuó una incubación a 37 °C por 1 hora. Luego, se guardó el tubo de reacción a -20 °C.

Finalmente, sobre la muestra cADN obtenida, se llevó a cabo la reacción de *PCR* correspondiente.

Protocolo de *PCR*: Se utilizó el mismo “*PROTOCOLO GENERAL DE PCR*” en todas las amplificaciones realizadas en este trabajo, incluidas ambas rondas de *PCR anidada*.

PROTOCOLO GENERAL DE PCR

- **Mezcla de reactivos:** 2.5 unidades de GoTaq® DNA Polymerase (Promega), Buffer de Reacción Green GoTaq® (concentración final 1 X), MgCl₂ (concentración final 1.5 mM), dATP (concentración final 200 µM), dCTP (concentración final 200 µM), dTTP (concentración final 200 µM), dGTP (concentración final 200 µM), primer directo (concentración final 400 nM) y primer reverso (concentración final 400 nM)

- Programa de termociclador usado: “BCR-ABL1”

35 ciclos	}	4 minutos 94 °C (desnaturalización inicial)
		0,5 minutos 94 °C (desnaturalización)
		1 minutos 65 °C (anillado)
		2 minutos 72 °C (extensión)
		5 minutos 72 °C (extensión final)
		5 minutos 25 °C (final de PCR)

2.3.1. Detección de transcritos *BCR-ABL1* mediante *RT-PCR anidada*

2.3.1.1. DETECCIÓN DE TRANSCRIPTOS *BCR-ABL1 p190 e1-a2*

Luego de efectuar la reacción de transcripción reversa de la muestra de ARN total, se llevaron a cabo las dos rondas de *PCR anidada* de acuerdo con “*PROTOCOLO GENERAL DE PCR*”. Para la primera ronda de amplificación se usó el primer directo BCR-e1-A y el primer reverso ABL-a3-B (referirse a tabla II.1 para ver la secuencia de nucleótidos de dichos primers. El volumen final de cada reacción fue de 25 µL, compuesto por 22.5 µL de mezcla de reactivos y 2.5 µL de muestra cADN. Para la segunda ronda de amplificación se usó el primer directo BCR-e1-C y el primer reverso ABL-a3-D (ver tabla II.1). El volumen final de reacción fue de 25 µL, compuesto por 22.5 µL de mezcla de reactivos y 2.5 µL del producto amplificado en la primera ronda de *PCR*.

Tabla II.1. Primers para análisis por *RT-PCR* de t(9;22)(q34;q11) con el gen de fusión *BCR-ABL1 p190 e1-a2*. Extraída de (1)

Primer	Posición 5' (tamaño en pb)	Secuencia (5'-3')
BCR-e1-A	1479 (21)	GACTGCAGCTCCAATGAGAAC
ABL-a3-B	458 (21)	GTTTGGGCTTCACACCATTC
BCR-e1-C	1602 (21)	CAGAACTCGCAACAGTCCTTC
ABL-a3-D	441 (23)	TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA

2.3.1.2. DETECCIÓN DE TRANSCRIPTOS *BCR-ABL1* p210 b3-a2 y p210 b2-a2

Luego de efectuar la reacción de transcripción reversa de la muestra de ARN total, se llevaron a cabo las dos rondas de *PCR anidada* de acuerdo con “*PROTOCOLO GENERAL DE PCR*”. Para la primera ronda de amplificación se usó el primer directo BCR-b1-A y el primer reverso ABL-a3-B (referirse a tabla II.2 para ver la secuencia de nucleótidos de dichos primers. El volumen final de cada reacción fue de 25 µL, compuesto por 22.5 µL de mezcla de reactivos y 2.5 µL de muestra cADN. Para la segunda ronda de amplificación se usó el primer directo BCR-b2-C y el primer reverso ABL-a3-D (ver tabla II.2). El volumen final de reacción fue de 25 µL, compuesto por 22.5 µL de mezcla de reactivos y 2.5 µL del producto amplificado en la primera ronda de *PCR*.

Tabla II.2. Primers para análisis por *RT-PCR* de t(9;22)(q34;q11) con el gen de fusión *BCR-ABL1* p210 b3-a2 ó p210 b2-a2. Extraído de (1)

<i>Primer</i>	<i>Posición 5' (tamaño en pb)</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>
BCR-b1-A	3086 (22)	GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC
ABL-a3-B	458 (21)	GTTTGGGCTTCACACCATTCC
BCR-b2-C	3126 (21)	CAGATGCTGACCAACTCGTGT
ABL-a3-D	441 (23)	TTCCCATTGTGATTATAGCCTA

2.3.2. Generación de moléculas controles positivos *BCR-ABL1* mediante *PCR*

El control positivo de cada tipo de transcripto *BCR-ABL1* se generó utilizando el mismo protocolo de reacción correspondiente a la primera ronda de amplificación para la detección de dicho transcripto. Se usó, como material de partida, una muestra cADN previamente determinada positiva para el tipo de translocación correspondiente.

2.4.1.1. *Generación del Competidor p190 e1-a2*

El *Competidor p190 e1-a2* se generó siguiendo el “*PROTOCOLO GENERAL DE PCR*” sobre una muestra cADN positiva para dicha translocación. Se usó el primer directo BCR-e1-A y el primer reverso BCR-ABL-COM. El volumen final de reacción fue de 25 µL, compuesto por 22.5 µL de mezcla de reactivos y 2.5 µL de muestra cADN.

2.4.1.2. *Generación de Competidores p210 b3-a2 y p210 b2-a2*

Los *Competidores p210 b3-a2 y p210 b2-a2* se generaron siguiendo el “*PROTOCOLO GENERAL DE PCR*” sobre muestras cADN positivas para cada translocación. El juego de primers utilizado es el mismo para ambos tipos de competidores: primer directo BCR-b1-A y primer reverso BCR-ABL-COM. El volumen final de reacción fue de 25 µL, compuesto por 22.5 µL de mezcla de reactivos y 2.5 µL de muestra cADN.

2.4.2. **Generación del Competidor ABL1** mediante *PCR*

El *Competidor ABL1* se generó mediante una reacción de amplificación siguiendo el “*PROTOCOLO GENERAL DE PCR*”, llevada a cabo con el primer directo ABL-UP y el primer reverso ABL-COM.

Secuencia de nucleótidos del primer ABL-COM:

5'CGACGGGCCTGACACCTGACC**GAGGAGCTTGCTGAA** 3'

ABL-LOW

F ABL-COM

El volumen final de reacción fue de 25 µL, compuesto por 22.5 µL de mezcla de reactivos y 2.5 µL de una muestra cADN de un paciente.

2.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Las electroforesis fueron hechas en geles de agarosa 2 % en Buffer TBE, conteniendo bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y con Buffer de corrida TBE. Luego se efectuó la visualización de los geles con un transiluminador ultravioleta y posterior fotografía digital. El análisis de las imágenes fue realizado con el programa GelPro.

2.6. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

Cepa bacteriana: Se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5 α .

Plásmido: Se usó el plásmido TOPO, pGEM®-T Easy Vector (Promega).

2.7. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Protocolo: Se inocularon 50 mL de medio LB con 500 μL de cultivo de toda la noche de la cepa *E.coli* DH5 α , y se dejó crecer hasta densidad óptica (OD) 600 nm de 0.4- 0.6. Se incubó por 20 minutos en hielo. Se centriugó por 4 minutos a 4000 rpm a 4 °C. Se resuspendió suavemente en 25 mL de CaCl_2 50mM. Se incubó por 10 minutos en hielo. Se centrifugó por 4 minutos a 4000 rpm a 4 °C. Se resuspendió en 5 mL compuestos por: 4.5 mL de CaCl_2 50 mM y 0.5 mL de Glicerol, y se guardó a -80 °C.

2.8. LIGACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR Y TRANSFORMACIÓN

2.8.1. **Ligación:** Se procedió de acuerdo al protocolo sugerido por PROMEGA (17): Se centrifugó el vector pGEM®-T Easy Vector y los tubos con el inserto de ADN a clonar. Se efectuaron las reacciones de ligación como se detalla a continuación:

a) *Reacción estándar:*

5 μ L de 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase
1 μ L de pGEM®-T Easy Vector (50 ng)
1 μ L de T4 DNA Ligase (3 unidades Weiss/ μ L)
1 μ L de agua deionizada
2 μ L de producto de *PCR*

b) *Control positivo con plásmido sin cortar:*

5 μ L de 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase
1 μ L de pGEM®-T Easy Vector (50 ng)
1 μ L de T4 DNA Ligase (3 unidades Weiss/ μ L)
1 μ L de agua deionizada
2 μ L de plásmido sin cortar

c) *Control de background:*

5 μ L de 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase
1 μ L de pGEM®-T Easy Vector (50 ng)
1 μ L de T4 DNA Ligase (3 unidades Weiss/ μ L)
3 μ L de agua deionizada

Se mezclaron las reacciones con la pipeta, y se incubaron toda la noche a 4 °C para obtener el número máximo de transformantes.

2.8.2. Transformación de células competentes de *E.coli* DH5 α

Se procedió de acuerdo al protocolo sugerido por PROMEGA (17): Se prepararon placas LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal. Se centrifugaron las reacciones de ligación, luego de lo cual, se agregaron 2 μ L de cada reacción a un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril puesto en hielo. Se preparó un tubo control con 0.1 ng de plásmido sin cortar. Se colocaron las células competentes de *E. coli* DH5 α en un baño de hielo por 5 minutos hasta su descongelamiento. Se transfirieron cuidadosamente 50 μ L de células a los tubos de cada reacción de ligación. Se usaron 100 μ L de células para el tubo control con ADN sin cortar. Se incubaron en hielo los tubos por 20 minutos. Las células fueron luego incubadas por 50 segundos en baño de agua a 42 °C e inmediatamente regresados a hielo por 2 minutos. Se agregaron 950 μ L de medio SOC a temperatura ambiente a las transformaciones con reacción de ligación y 900 μ L al tubo control con ADN sin cortar. Luego se incubó por 1.5 horas a 37 °C con agitador (aproximadamente a 150 rpm). Se plaquearon 100 μ L de cada cultivo de transformación sobre placas LB/Ampicilina/IPTG/ X-Gal por duplicado. Se incubaron las placas toda la noche a 37 °C. Luego se seleccionaron las colonias blancas.

2.9. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Protocolo: Se cultivó toda la noche la cepa bacteriana conteniendo el plásmido en 3mL de medio LB con Ampicilina (100 μ g/mL). Se peleteó el cultivo centrifugando 3 minutos a 5000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se despegó el pellet y resuspendió en 100 μ L de SL1 fría. Luego se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200 μ L de SL2 y se mezcló suavemente por inversión hasta que quedó transparente. Se agregaron 150 μ L de SL3, se agitó vigorosamente e incubó 5 minutos en hielo. Se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo conteniendo

300 μ L de NaI 6M y 20 μ L de NaAc 3M pH 5,5. Se transfirió todo el volumen a una columna proveniente del kit de purificación de ADN genómico de QIAGEN. Se centrifugó 1 minuto a 13.000 rpm. Se lavó la columna con 700 μ L de etanol al 80 % . Luego, se centrifugó por 1 minuto a 13.000 rpm descartando el eluído. Se lavó nuevamente la columna con 700 μ L de etanol al 80 % . Luego, se centrifugó por 1 minuto a 13.000 rpm descartando el eluído Se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se agregaron a la columna 100 μ L de agua estéril, se esperó 1 minuto y luego se centrifugó 1 minuto a 13.000 rpm.

CAPÍTULO 3

COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES

CAPÍTULO 3

COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES

BUFFER TBE 1X (Tris-Borato-EDTA): Tris 89 mM, Acido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM.

LB AGAR: Medio LB líquido, AGAR-AGAR 1.5 % P/V

MEDIO LB (Luria Bertani): Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L.

MEDIO SOC: Extracto de levadura 0.5 % P/V, Triptona 2 % P/V, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 10 mM, glucosa 20 mM.

PLACA LB AGAR/Ampicilina/IPTG/XGAL: Medio LB AGAR autoclavado, Ampicilina 100 µg/mL, IPTG 0.5 mM estéril, XGAL 25 µg/mL estéril.

SL1: 25 mM Tris HCl pH 8; 10 mM EDTA; 50 mM glucosa

SL2: 0.2 N NaOH; 1 % P/V SDS

SL3: 3 M KAc, pH: 5,5

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1. DETECCIÓN DE TRANSCRIPTOS *BCR-ABL1* MEDIANTE *RT-PCR ANIDADA*

En el presente trabajo, el primer objetivo específico planteado fue implementar y optimizar un protocolo de *detección* de transcritos *BCR-ABL1*. Se propuso abordar dicho objetivo haciendo uso de la técnica *RT-PCR anidada*.

Aunque la *RT-PCR* es una técnica muy sensible, su sensibilidad puede ser incrementada utilizando la estrategia de *RT-PCR anidada* (18). Esto involucra tomar una alícuota del producto de la primera *RT-PCR* y usarla como molde para una segunda ronda de amplificación por *PCR*. Para evitar amplificación de artefactos dímeros de primers o productos inespecíficos generados en la primera ronda de *PCR*, un juego diferente de primers es empleado en la segunda ronda. Estos primers “anidados” son *internos* a los primers usados en la primera *PCR*, generando un amplicón más corto que el generado por la primera amplificación (véase figura 4.1). Debido a que las secuencias de dichos primers “anidados” son diferentes a las de los primers iniciales, no amplificarán artefactos o productos inespecíficos generados en la primera *PCR*, lográndose, así, una especificidad de producto que se mantiene sobre un alto número de ciclos de amplificación combinados en la primera y segunda ronda (18).

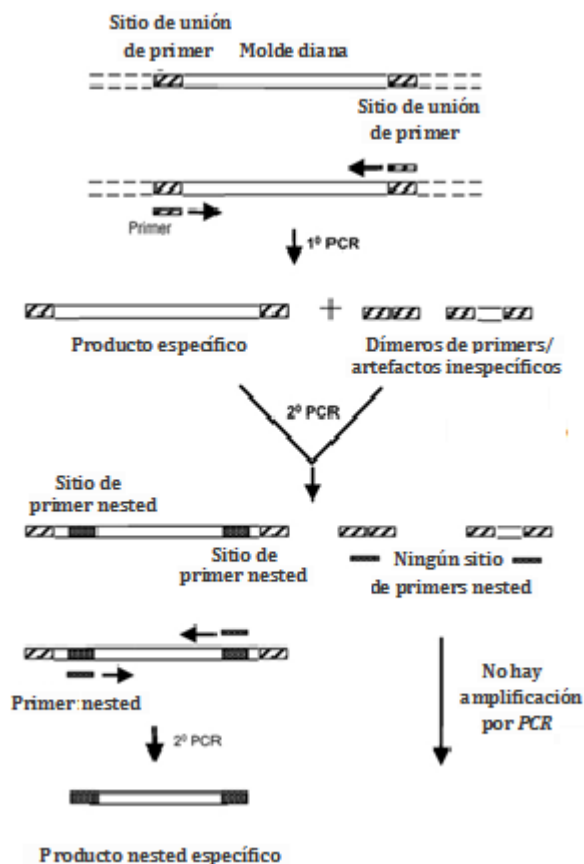


Figura 4.1. RT-PCR anidada. Figura tomada de (18).

4.1.1. Detección de transcritos *BCR-ABL1* p190 e1-a2 por RT-PCR anidada

Se implementó un protocolo de detección de transcritos *BCR-ABL1* p190 e1-a2 mediante la técnica de RT-PCR anidada basado en el protocolo descrito por (1). El protocolo consistió en lo siguiente: se extrajo ARN total de una muestra de sangre de un paciente potencialmente portador de la mutación *BCR-ABL1* p190 e1-a2. Sobre la muestra de ARN total se efectuó una reacción de *transcripción reversa* con hexámeros al azar, luego de lo cual se realizaron dos rondas de amplificación por PCR: la primera, haciendo uso de un juego de *primers externos* (Bcr-e1-A / Abl-a3-B), y la segunda, usando un juego de *primers internos* (Bcr-e1-C / Abl-a3-D) (véase figura 4.2 para mayor detalle sobre la posición de los primers dentro de la secuencia del transcrito *BCR-ABL1* p190 e1-a2). Dichos juegos de primers fueron los utilizados en la bibliografía consultada (1). Luego de esto, los productos amplificados de ambas rondas fueron sujetos a electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio para su visualización. La aparición de la banda

correspondiente al amplicón p190 e1-a2 en la primera y/o segunda ronda confirmó la presencia de células portadoras de dicho tipo de translocación *BCR-ABL1* en la sangre del paciente.

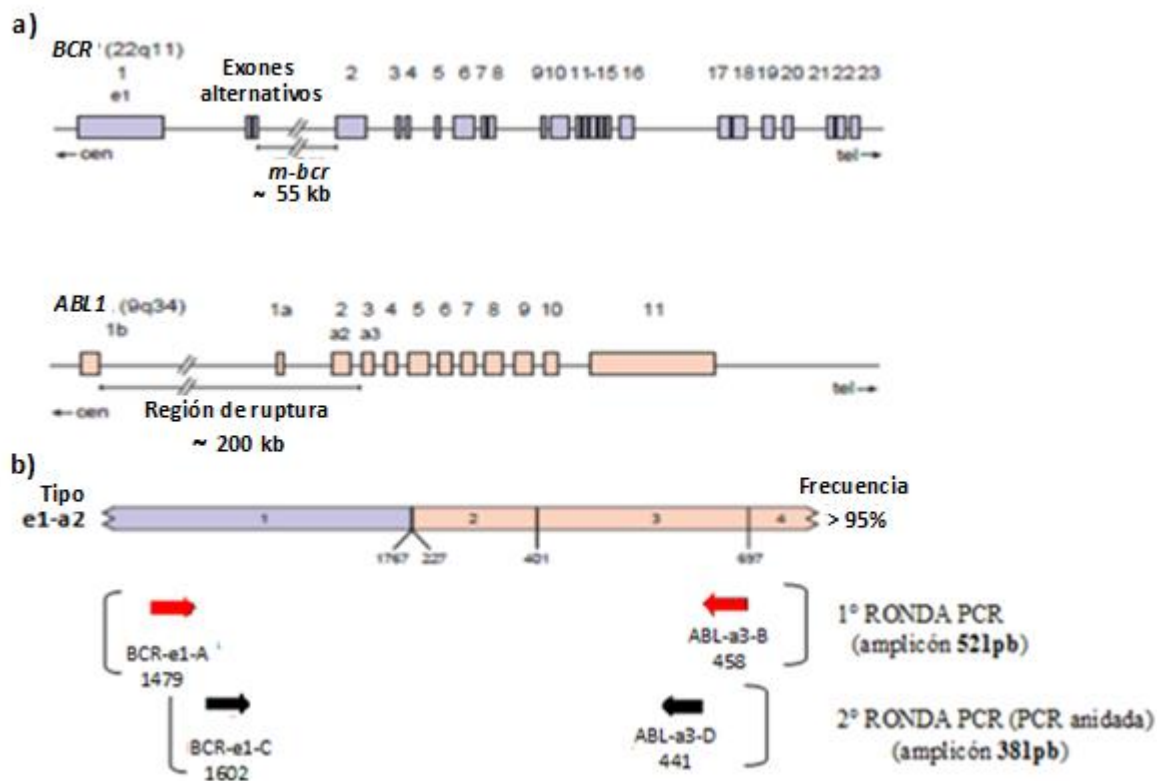


Figura 4.2. (a) Diagrama esquemático de la estructura exón/intrón de los genes *BCR* y *ABL1*, involucrados en t(9;22)(q34;q11), el cual se focaliza sobre la región *m-bcr*. El centrómero (*cen*) y la orientación del telómero (*tel*), numeración de exones, y las regiones de ruptura son indicados. La nomenclatura antigua para el exón 1 del *BCR* y exones 2 y 3 del *ABL1* también son indicados. (b) Diagrama esquemático del transcripto p190 mayoritario. Los números debajo de los transcritos del gen de fusión se refieren al primer nucleótido (5') del exón involucrado (gen *ABL1*), excepto cuando el último nucleótido (3') del gen corriente arriba (gen *BCR*) sea indicado. La numeración debajo de los exones *ABL1* corresponde a la variante "a" de dicho transcripto. El transcripto de fusión p190 e1-a2 se encuentra más frecuentemente (en más del 95% de los casos), pero casos esporádicos con transcritos p190 e1-a3 se han reportado. Las flechas indican la posición relativa de los primers; los dos primers *ABL* son idénticos a aquellos usados para la detección de transcritos p210. Los números se refieren a la posición del nucleótido 5' de cada primer. También, se muestra la ubicación relativa del juego de *primers externos* con respecto al juego de *primers internos*, y los tamaños de los amplicones correspondientes a cada ronda de *PCR*. La figura fue modificada a partir de una presentada en (1).

4.1.1.1. Chequeo de amplificación por *PCR anidada* del transcripto p190 e1-a2:

Como se puede observar en figura 4.3, se lograron condiciones de amplificación efectivas, sin generación de productos espúreos. Los tamaños de los amplicones obtenidos concuerdan con los esperados para cada ronda de *PCR*.

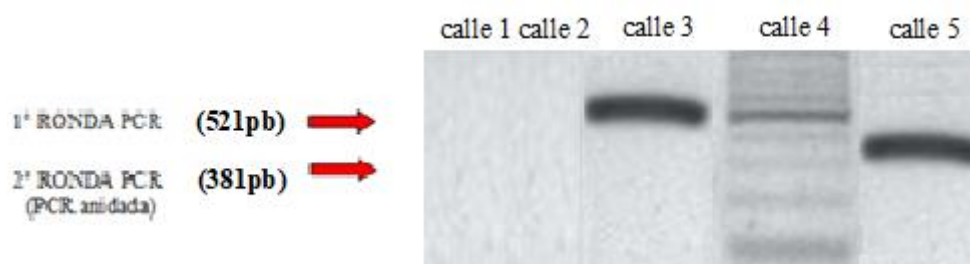


Figura 4.3. Fotografía de gel de agarosa 2 % correspondiente a electroforesis de los productos de amplificación por *PCR anidada* del transcripto p190 e1-a2. Calle 1: control negativo de primera ronda de *PCR*. Calle 2: control negativo de segunda ronda de *PCR*. Calle 3: producto amplificado de la primera ronda de *PCR* (521 pb). Calle 5: producto amplificado de la segunda ronda de *PCR* (381 pb). Calle 4: marcador "100 bp DNA ladder" (Invitrogen).

4.1.2. Detección de transcriptos p210 mediante *RT-PCR anidada*

Se implementó un protocolo de detección de transcriptos *BCR-ABL1* p210 mediante la técnica de *RT-PCR anidada* basado en el protocolo descrito por (1). El protocolo consistió en lo siguiente: se extrajo ARN total de una muestra de sangre de un paciente potencialmente portador de la mutación *BCR-ABL1* p210 (b3-a2 ó b2-a2). Sobre la muestra de ARN total se efectuó una reacción de *transcripción reversa* con hexámeros al azar, luego de lo cual se realizaron dos rondas de amplificación por *PCR*: la primera, haciendo uso de un juego de *primers externos* (Bcr-b1-A / Abl-a3-B), y la segunda, usando un juego de *primers internos* (Bcr-b2-C / Abl-a3-D). (véase figura 4.4 para mayor detalle sobre la posición de los primers dentro de la secuencia de los transcriptos *BCR-ABL1*p210). Dichos juegos de primers fueron los utilizados en la bibliografía consultada (1). Luego de esto, los

productos amplificados de ambas rondas fueron sujetos a electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio para su visualización. Para ambos tipos de transcritpo p210, la aparición de la banda correspondiente al amplicón p210, en la primera y/o segunda ronda confirmó la presencia de células portadoras de dicho tipo de translocación *BCR-ABL1* en la sangre del paciente.

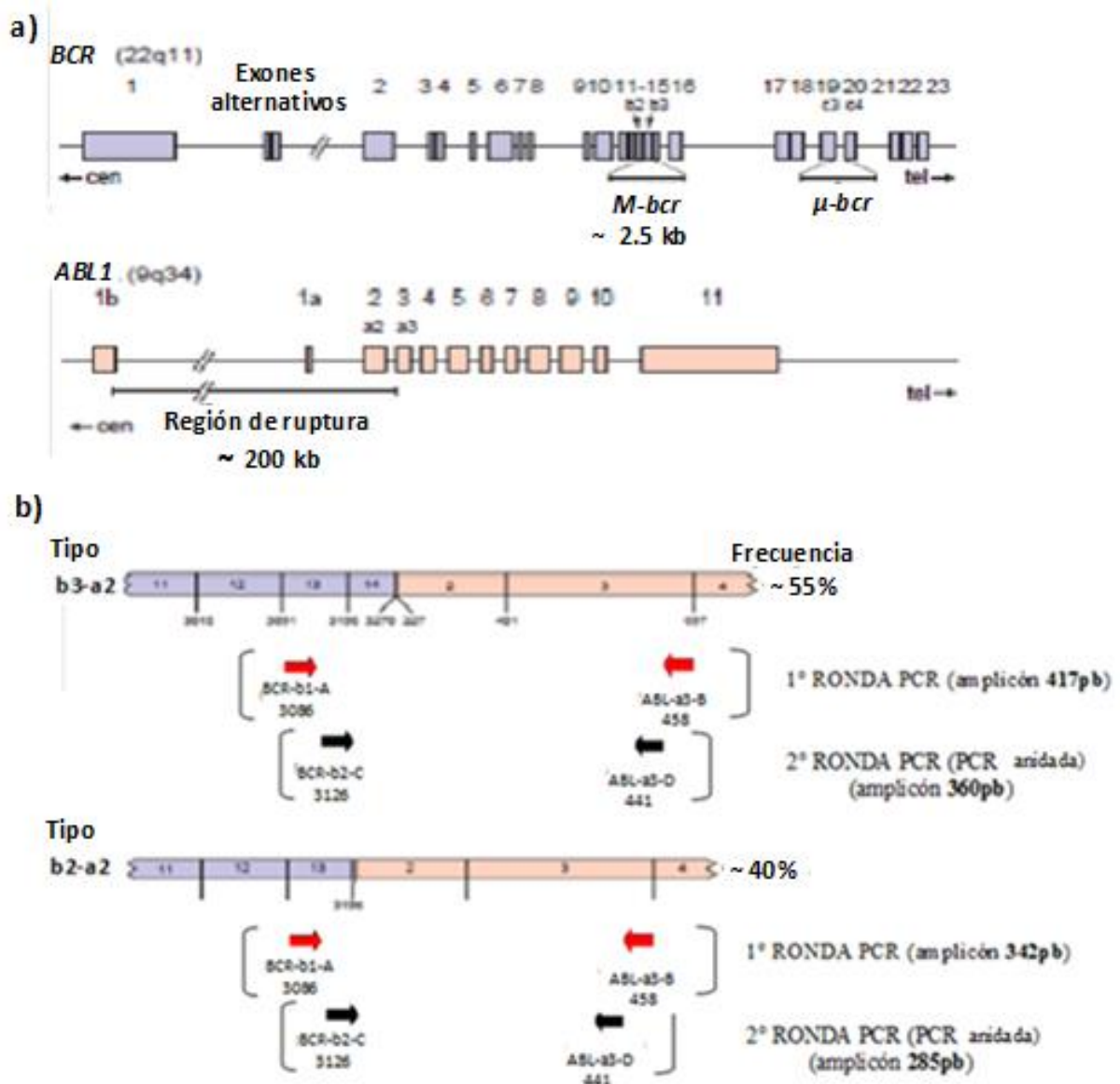


Figura 4.4. (a) Diagrama esquemático de la estructura exón/intrón de los genes *BCR* y *ABL1* involucrados en la t(9;22)(q34;q11), el cual se focaliza sobre la región M-bcr. El centrómero (cen) y la orientación del telómero (tel), la numeración de exones, y las regiones de ruptura relevantes son indicados. La nomenclatura antigua de los exones *BCR* y *ABL1* es parcialmente indicada. (b) Diagrama esquemático de los transcriptos *BCR-ABL1* p210. Los números debajo de los transcriptos del gen de fusión se refieren al primer nucleótido (5') del exón involucrado (gen *ABL1*), excepto cuando el último nucleótido (3') del gen corriente arriba (gen *BCR*) sea indicado. La numeración debajo de los exones *ABL1* corresponde a la variante "a" de dicho transcripto. Los transcriptos p210 b3-a2 y p210 b2-a2 son encontrados más frecuentemente, pero casos esporádicos con transcriptos p210 b3-a3 y p210 b2-a3 se han reportado. Las flechas indican la posición relativa de los primers; los dos primers ABL son idénticos a aquellos usados para la detección de transcriptos *BCR-ABL1* p190. Los números se refieren a la posición del nucleótido 5' de cada primer. También, se muestra la ubicación relativa de los juegos de *primers externos* con respecto a los juegos de *primers internos*, y los tamaños de los amplicones correspondientes a cada ronda de *PCR*, para ambos tipos de transcripto p210. La figura fue modificada a partir de una presentada por (1).

4.1.2.1. Chequeo de amplificación por *PCR anidada* del transcripto p210 b3-a2

Como se puede observar en figura 4.5, se lograron condiciones de amplificación efectivas, sin generación de productos espúreos. Los tamaños de los amplicones obtenidos concuerdan con los esperados para cada ronda de *PCR*.

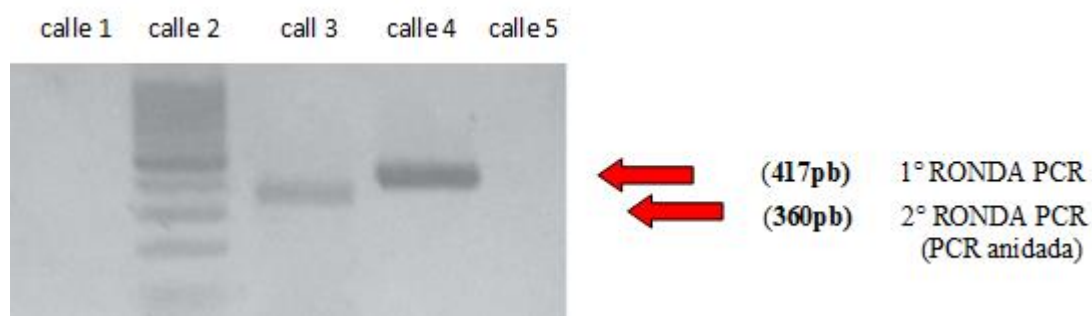


Figura 4.5. Fotografía de gel de agarosa 2 % correspondiente a electroforesis de los productos de amplificación por *PCR anidada* del transcripto p210 b3-a2. Calle 4: producto amplificado de la primera ronda de *PCR* (417pb). Calle 3: producto de amplificado de la segunda ronda de *PCR* (360pb). Calle 1: control negativo de primera ronda de *PCR*. Calle 5: control negativo de segunda ronda de *PCR*. Calle 2: marcador "100 bp DNA ladder" (Invitrogen).

4.1.2.2. Chequeo de amplificación por *PCR anidada* del transcripto p210 b2-a2

Como se puede observar en figura 4.6, se lograron condiciones de amplificación efectivas, sin generación de productos espúreos. Los tamaños de los amplicones obtenidos concuerdan con los esperados para cada ronda de *PCR*.

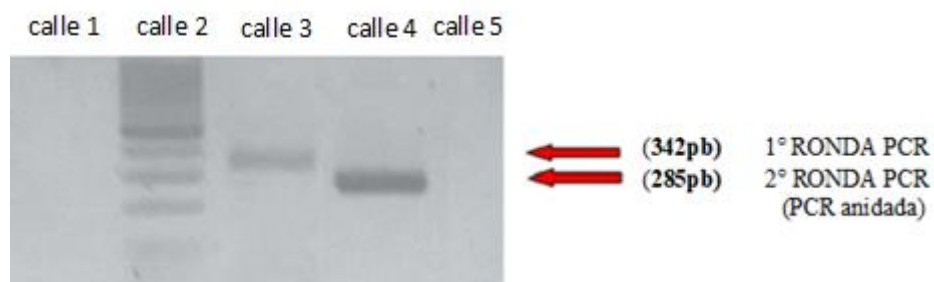


Figura 4.6. Fotografía de gel de agarosa 2 % correspondiente a electroforesis de los productos de amplificación por *PCR anidada* del transcripto p210 b2-a2. Calle 3: producto amplificado de la primera ronda de *PCR* (342 pb). Calle 4: producto de amplificado de la segunda ronda de *PCR* (285 pb). Calle 1: control negativo de la primera ronda de *PCR*. Calle 5: control negativo de la segunda ronda de *PCR*. Calle 2: marcador “100 bp DNA ladder” (Invitrogen).

Para conocer la *sensibilidad y precisión* del protocolo de detección de transcritos era necesario contar con moléculas de ADN controles positivos clonadas. El siguiente objetivo específico de este trabajo fue generar dichos controles positivos.

4.2. GENERACIÓN DE MOLÉCULAS CONTROLES POSITIVOS *BCR-ABL1*

Con el objetivo de generar controles positivos estables para los análisis de la translocación que fueron implementados en los apartados anteriores, se decidió generar plásmidos que contuvieran las secuencias que se amplifican en el protocolo. Con este fin, se generaron moléculas de ADN controles positivos de cada uno de los tipos de transcripto *BCR-ABL1*, mediante *PCR* a partir de muestras cADN previamente identificadas como

positivas. Se usaron las mismas condiciones de reacción que para la primera ronda de *PCR anidada* en la detección del correspondiente transcripto.

Dichos productos de *PCR* fueron utilizados, posteriormente, como inserto en la reacción de ligación con el vector pGEM®-T Easy Vector (Promega), para obtener el respectivo “control positivo” clonado. Las colonias positivas se evaluaron mediante extracción de ADN plasmídico y posterior *PCR* con los primers usados para la amplificación del fragmento a clonar. De este modo se determinó que se logró clonar el *Control Positivo* p190 e1-a2 y el p210 b2-a2, no así el p210 b3-a2.

4.3. GENERACIÓN DEL *CONTROL POSITIVO ABL1*

El gen *ABL1*, mediante splicing alternativo, expresa dos tipos de transcripto *ABL1*, los cuales difieren sólo en el primer exón 1A ó 1B, compartiendo los otros 10 exones. La “variante a” contiene el exón 1A, mientras que la “variante b” contiene el exón 1B (19).

Se diseñaron los primers ABL-UP y ABL-LOW mediante el programa “Primer Select” (LaserGene). Mediante *PCR* sobre una muestra de cADN de un paciente, se generó el *Control Positivo ABL1* con los primers ABL-UP y ABL-LOW que se unen a secuencias del exón 11 del gen *ABL1* (mostrados en la figura 4.7). El exón 11 está conservado en ambas variantes del transcripto y los primers generan un amplicón de 252 pb. La reacción de *PCR* se efectuó siguiendo el “*PROTOCOLO GENERAL DE PCR*” descrito en “Materiales y Métodos”.

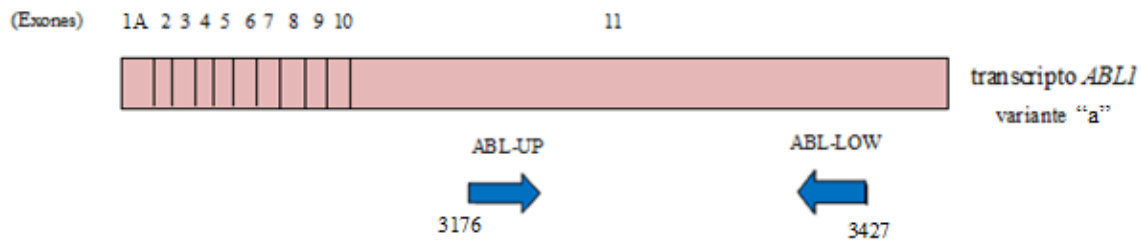


Figura 4.7. Estructura del transcrito *ABL1* ("variante a") procesado. Se indica también la posición de los primers utilizados para su amplificación por *PCR*. Los números se refieren a la posición del nucleótido 5' de cada primer.

4.3.1. Chequeo de amplificación del transcrito *ABL1* para generación del *Control Positivo ABL1*

Como puede verse en figura 4.8, la amplificación del transcrito *ABL1* por *PCR* fue exitosa y el tamaño del amplicón obtenido fue el esperado. Dicho producto de *PCR* fue utilizado, posteriormente, como inserto en la reacción de ligación con el vector plasmídico pGEM®-T Easy Vector, para obtener el *Control Positivo ABL1* clonado. Las colonias positivas se evaluaron mediante extracción de ADN plasmídico y posterior *PCR* con los primers usados para la amplificación del fragmento a clonar. De este modo se logró determinar que dicho paso de clonación fue exitoso.

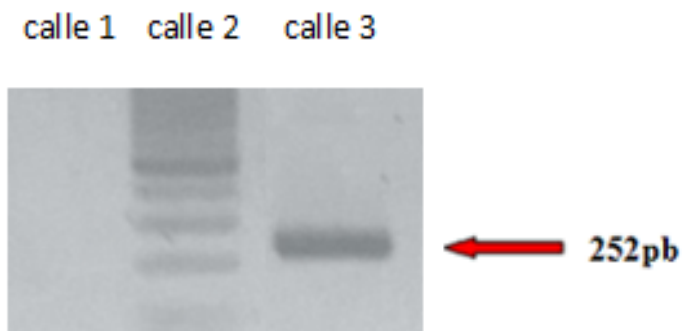


Figura 4.8. Fotografía de gel de agarosa 2 % correspondiente a electroforesis del amplicón *Control Positivo ABL1*. Calle 3: producto amplificado correspondiente al transcrito *ABL1* (252 pb). Calle 1: control negativo. Calle 2: marcador "100 bp DNA ladder" (Invitrogen).

4.4. RESUMEN DE RESULTADOS DE GENERACIÓN DE CONTROLES POSTIVOS CLONADOS

Se logró clonar exitosamente:

- *Control Positivo* del gen *ABL1*
- *Control Positivo* del gen de fusión p210 b2a2
- *Control Positivo* del gen de fusión p190 e1a2

No se logró clonar:

- *Control Positivo* del gen de fusión p210 b3a2

4.5. CUANTIFICACIÓN DE TRANSCRIPTOS

En el presente trabajo, se propuso estimar la cantidad de transcritos *BCR-ABL1* referidos o normalizados a la cantidad de transcritos del gen de referencia *ABL1*. Se propuso estimar la cantidad de transcritos *BCR-ABL1* mediante la técnica de *RT-PCR anidada competitiva* y de transcritos *ABL1* (*gen de referencia*) mediante *RT-PCR competitiva*, siguiendo los lineamientos presentados en la literatura consultada (1,15).

- *Sistema propuesto de cuantificación del número de copias de transcritos BCR-ABL1 por RT-PCR anidada competitiva:*

Luego de efectuar la reacción de *RT*, se propuso la cuantificación del número de copias *BCR-ABL1* por *PCR anidada competitiva*. Esta técnica consta de una serie de reacciones de co-amplificación del cADN obtenido en la *RT* y distintas cantidades (conocidas) de ADN “competidor” *BCR-ABL1*, del tipo correspondiente a la translocación *BCR-ABL1* específica a analizar, en dos rondas consecutivas

de *PCR*, usando para la primera, un juego de *primers externos*, y para la segunda, un juego de *primers internos (PCR anidada)*. El ADN “competidor” presenta las mismas secuencias de unión a primers que el cADN, pero al ser amplificado genera un amplicón de un tamaño molecular menor al amplicón de la propia translocación *BCR-ABL1*. Es decir, se lleva a cabo la reacción de *PCR* en varios tubos; sobre cada tubo de reacción se coloca una misma cantidad de muestra cADN, pero se agrega una cantidad (conocida) diferente de ADN “competidor” *BCR-ABL1*. Se efectúa la primera ronda de *PCR* (con el juego de *primers externos*), y luego el producto amplificado de cada tubo es sujeto a una segunda ronda de *PCR* (con juego de *primers internos*) (véase el ejemplo ilustrativo de figura 4.9 para una mejor comprensión del protocolo propuesto). Posteriormente, los productos amplificados son sometidos a una electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Luego de una digitalización fotográfica, se procede al análisis, en cada calle del gel, de las intensidades de bandas correspondientes al amplicón generado por la translocación *BCR-ABL1* y al amplicón generado por el ADN “competidor”, por medio de un programa de análisis digital. La cuantificación del número de copias *BCR-ABL1* se realiza comparando las intensidades relativas de la banda *BCR-ABL1* y la banda del ADN “competidor” en la calle que presente mayor similitud de intensidades entre ambas bandas.

El cálculo se realiza en base a la siguiente fórmula:

$$Ct = It \cdot PM_{comp} \cdot C_{comp} / (I_{comp} \cdot PM_t) \quad [\text{Fórmula III}]$$

- **Donde cada variable se define de acuerdo a lo siguiente:** **Ct**: cantidad de amplicón de la translocación; **It**: intensidad de banda de la translocación; **Ccomp**: cantidad de amplicón del competidor; **Icomp**: intensidad de banda del competidor; **PMt**: peso molecular del amplicón de la translocación; **PMcomp**: peso molecular del amplicón del competidor.

Diferencias de eficiencias de amplificación entre la secuencia diana de tipo salvaje y el competidor pueden permitir una cuantificación *relativa* muy precisa. Para cuantificación *absoluta*, es importante demostrar que las eficiencias de amplificación de ambas secuencias sean iguales (14). En este caso, dado que ambos fragmentos a amplificar poseen secuencias similares, asumimos para esta primera etapa del desarrollo que sus eficiencias de amplificación también son similares.

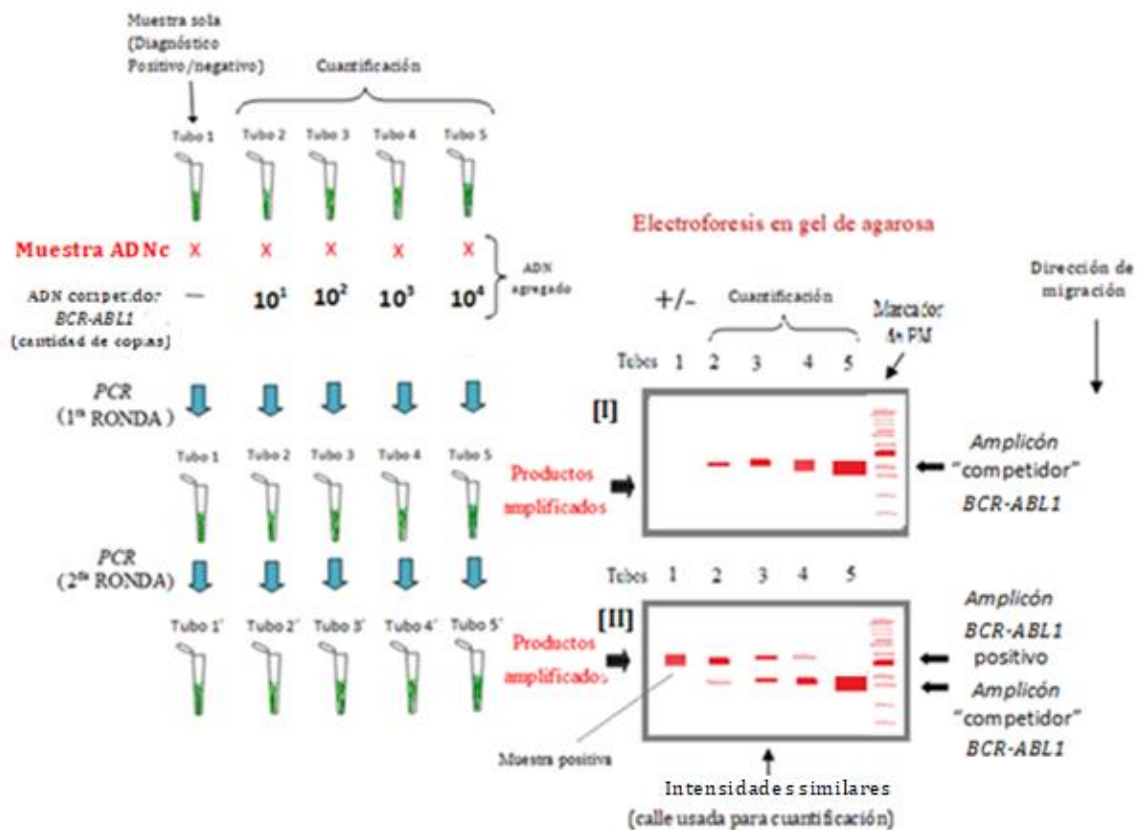


Figura 4.9. Ejemplo ilustrativo del protocolo propuesto de cuantificación de transcriptos *BCR-ABL1* mediante *PCR anidada competitiva*. Todos los tubos de reacción de *PCR* (tubos 1 al 5) contienen el mismo volumen (X) de muestra cADN a analizar, pero, en los tubos 2 al 5 una cantidad diferente de ADN competidor *BCR-ABL1* (cantidad conocida) fue agregada a cada uno. Luego de efectuada la primera ronda de *PCR* con un juego de *primers externos*, los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa (gel [I]). En este ejemplo, no se observan bandas de amplificación en la primera ronda para ninguno de los tubos, dada la baja cantidad de ADN amplificable. A continuación, se procedió a una segunda ronda de *PCR* (*PCR anidada*) con un juego de *primers internos*, para obtener una mayor sensibilidad. Es decir, el producto amplificado de cada tubo fue sometido a una nueva *PCR*. En el ejemplo, la re-amplificación del Tubo 1 (Tubo 1') produjo un amplicón de tamaño concordante con el control positivo *BCR-ABL1*, con lo cual, se determina que la muestra es *BCR-ABL1* positiva (gel [II]). Además, se procedió a la cuantificación del número de copias *BCR-ABL1* mediante el análisis de las intensidades relativas de los amplicones *BCR-ABL1* y competidor *BCR-ABL1* en las calles del gel correspondientes a los Tubos 2' al 5'. En este ejemplo, la cuantificación se realizó en base a las bandas de la calle del Tubo 3', dado que en ella ambos amplicones presentaron similar intensidad de banda. Más específicamente, dado que la intensidad de ambas bandas del tubo 3 son iguales en el ejemplo, el número de moléculas cADN *BCR-ABL1* presentes inicialmente en Tubo 3 (y en todos los demás tubos), previo a la primera ronda de *PCR*, es igual al número de copias de ADN competidor *BCR-ABL1* agregadas en Tubo 3, corregida por diferencias de tamaño entre los amplicones. Luego, haciendo los cálculos correspondientes, se llega a estimar el número de copias *BCR-ABL1* en la muestra de partida.

- *Sistema propuesto de cuantificación del transcripto ABL1 (gen de referencia o control) por RT-PCR competitiva:*

Luego de la reacción de *RT*, se propuso cuantificar el número de copias *ABL1*, por *PCR competitiva*, la cual se lleva a cabo mediante una co-amplificación del cADN obtenido y distintas cantidades (conocidas) de ADN *Competidor ABL1* (de menor tamaño) (véase en figura 4.10 un ejemplo ilustrativo). La estrategia es similar a la explicada para *BCR-ABL1* en el apartado anterior, con la diferencia que en la cuantificación de *ABL1* se realiza una única amplificación por *PCR*, no dos como en *BCR-ABL1*. La razón de esta diferencia radica en que la cantidad de transcriptos

del gen *ABL1* son significativamente mayores a los de *BCR-ABL1*, por lo tanto no es necesario una estrategia de *RT-PCR* anidada para lograr su amplificación.

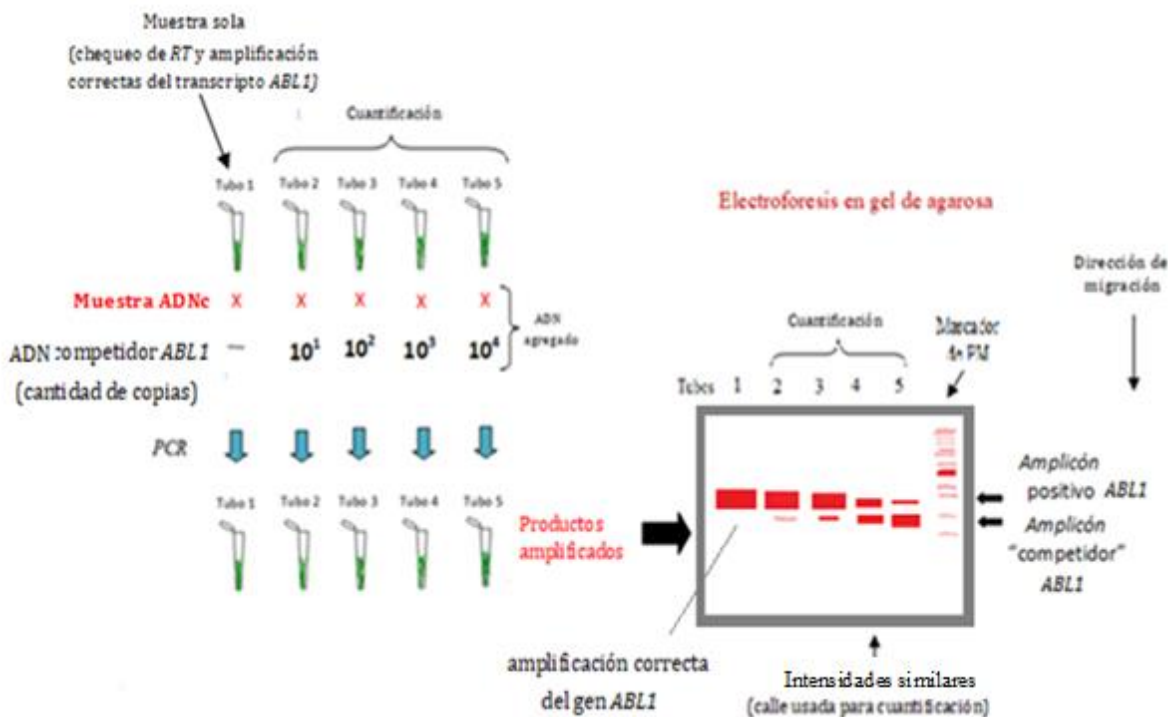


Figura 4.10. Ejemplo ilustrativo del protocolo propuesto de cuantificación de transcritos *ABL1* mediante *PCR* competitiva. Todos los tubos de reacción de *PCR* (tubos 1 al 5) contienen el mismo volumen (X) de muestra cADN a analizar, pero, en los tubos 2 al 5 una cantidad diferente de ADN competidor *ABL1* (cantidad conocida) es agregada a cada uno. Luego de efectuar la reacción de *PCR*, los productos amplificados son sometidos a electroforesis en gel de agarosa. En este ejemplo, se observa una correcta amplificación del transcrito *ABL1* (calle correspondiente al Tubo 1), lo cual confirma que las reacciones de *RT* y *PCR* transcurrieron en forma adecuada. Además, se procedió a la cuantificación del número de copias *ABL1* presentes en la muestra mediante el análisis de las intensidades relativas de los amplicones *ABL1* y competidor *ABL1* en las calles del gel correspondientes a los Tubos 2 al 5. La calle que sirvió, en este caso, para cuantificar, fue la correspondiente al Tubo 4, ya que ambos amplicones presentaron mayor similitud en su intensidad de banda. Más específicamente, dado que la intensidad de ambas bandas del tubo 3 son iguales en el ejemplo, el número de moléculas cADN *BCR-ABL1* presentes inicialmente en Tubo 3 (y en todos los demás tubos), previo a la primera ronda de *PCR*, es igual al número de copias de ADN competidor *BCR-ABL1* agregadas en Tubo 3, corregida por diferencias de tamaño entre los amplicones. Luego, haciendo los cálculos correspondientes, se llega a estimar el número de copias *BCR-ABL1* en la muestra de partida.

Para implementar las estrategias arriba descritas de cuantificación de transcritos *BCR-ABL1* y *ABL1* era necesario diseñar y construir las moléculas competidoras mencionadas. El criterio seguido para la construcción estuvo de acuerdo con lo presentado en la literatura analizada (15).

4.5.1. Construcción de moléculas competidoras

4.5.1.1. CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULAS COMPETIDORAS *BCR-ABL1*

4.5.1.1.1. Diseño de primers para sintetizar moléculas competidores *BCR-ABL1*

Para efectuar la reacción de *PCR anidada competitiva*, es necesario contar con una molécula de ADN que co-amplifique con el ADN del transcripto *BCR-ABL1* correspondiente, “compitiendo”, así, por los reactivos (incluidos los primers) en *ambas* rondas de *PCR anidada* (14,15). Dicho ADN “competidor”, debe contener las mismas secuencias de unión de primers que el respectivo transcripto *BCR-ABL1* a cuantificar, y además, debe generar un amplicón distinguible del *BCR-ABL1*. Para ello, se adoptó la estrategia de construir moléculas “competidoras” que generen amplicones más cortos que los generados por los respectivos transcritos *BCR-ABL1*, para poder distinguirlos mediante electroforesis de agarosa. Los primers ubicados en el extremo 5´ de las secuencias a amplificar (primers “directos”) fueron los indicados por la bibliografía para la primera ronda de amplificación de cada translocación (1). Para el extremo 3´ (primer “reverso”) se diseñó un único primer que permitía generar competidores para las tres translocaciones : p190 e1-a2, p210 b3-a2 y p210 b2-a2. Dicho primer se diseñó utilizando el programa “Primer Select” y se denominó “BCR-ABL-COM”. Este primer contiene tres secuencias del gen *ABL1* que se describen a continuación en orden 5´ a 3´ del primer:

1. Secuencia del primer ABL-a3-B del exón 3 (primer “reverso” usado en la primera ronda de *PCR anidada* en todas las reacciones de detección de transcritos *BCR-ABLI*) (1),
2. Secuencia correspondiente al primer ABL-a3-D del exón 3 (primer “reverso” usado en la segunda ronda de *PCR anidada* en todas las reacciones de detección de transcritos *BCR-ABLI*) (1),
3. Secuencia (F^{ABL}) que hibrida 86 nucleótidos corriente arriba (exón 2) de donde lo hace ABL-a3-B.

Este diseño implica que cada molécula amplicón “competidora” sea 42 pb menor que el correspondiente amplicón del control positivo. En las figuras 4.11, 4.12 y 4.13 se muestran los sitios de unión de los primers para cada tipo de competidor y los amplicones generados a partir del competidor y el control positivo respectivo, donde se aprecia la diferencia de tamaño entre ambos. Nótese que el primer BCR-ABL-COM unió al ADN molde solamente a través de su secuencia F^{ABL}, generando un producto conteniendo las secuencias ABL-a3-B, ABL-a3-D y F^{ABL} unidas en forma contigua. Los siguientes ciclos de amplificación produjeron un amplicón con los mismos extremos que el amplicón *BCR-ABLI* de tipo salvaje respectivo.

- *Competidor p190 e1-a2* (ver figura 4.11)

Se utilizó en la amplificación el siguiente juego de primers:

Primer directo	Primer reverso
BCR-e1-A	BCR-ABL-COM = ABL-a3-B_ABL-a3-D_F ^{ABL}

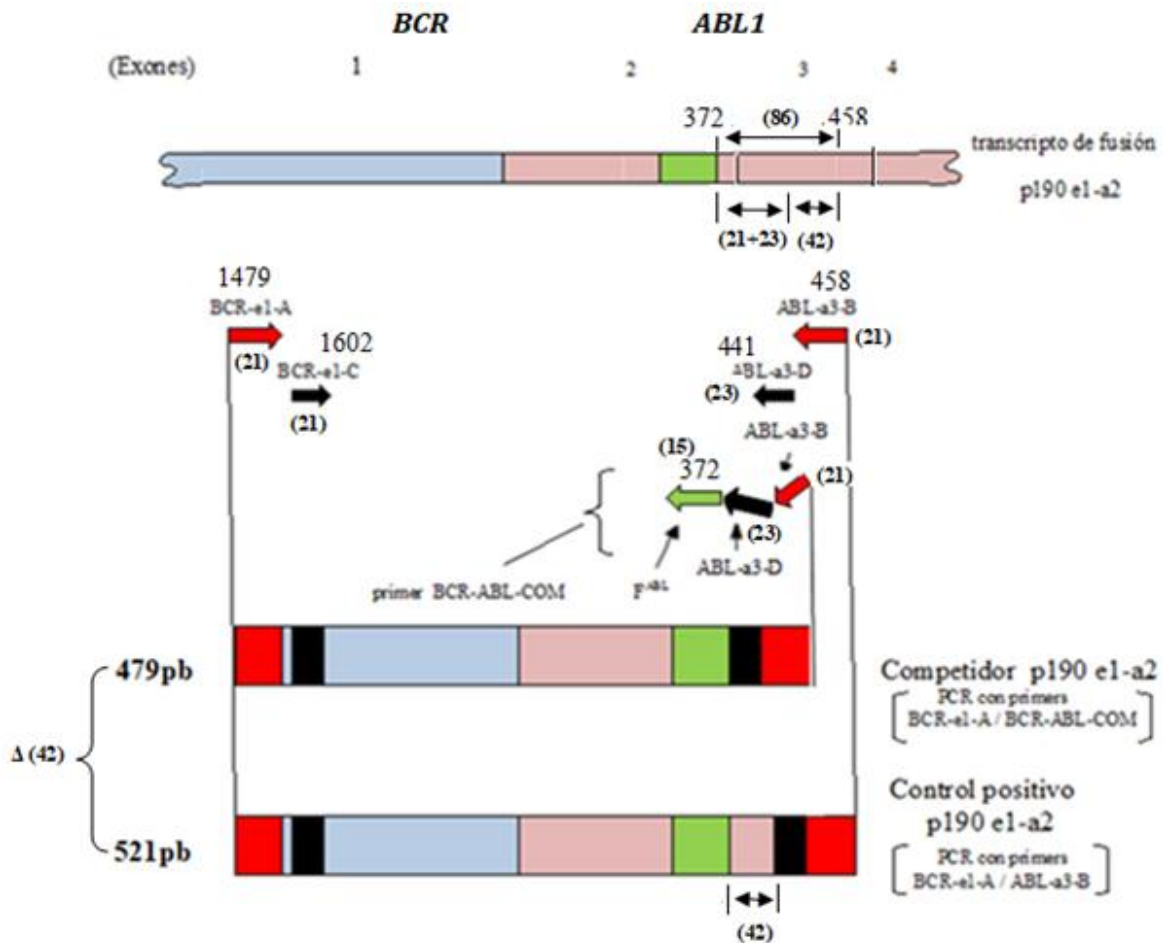


Figura 4.11. Generación del *Competidor* p190 e1-a2. Los números arriba de las flechas indican la posición del nucleótido 5' del primer. Nótese que el primer BCR-ABL-COM, usado para generar el *Competidor* p190 e1-a2, se anilló al molde específicamente a través de su secuencia F^{ABL}, generando un producto conteniendo las secuencias ABL-a3-B, ABL-a3-D y F^{ABL-COM} unidas en forma contigua. Los siguientes ciclos de amplificación produjeron un amplicón con los mismos extremos que el amplicón p190 e1-a2, es decir, con secuencias externas para unión del juego de primers de la primera ronda de PCR, y secuencias internas para la unión del juego de primers de la segunda ronda de PCR. Se puede apreciar la diferencia de tamaño entre dicho *competidor* y el *Control Positivo* p190 e1-a2.

- *Competidor p210 b3-a2* (ver figura 4.12)

Se utilizó en la amplificación el siguiente juego de primers:

Primer directo

Primer reverso

BCR-b1-A

BCR-ABL-COM = ABL-a3-B_ABL-a3-D_ F^{ABL}

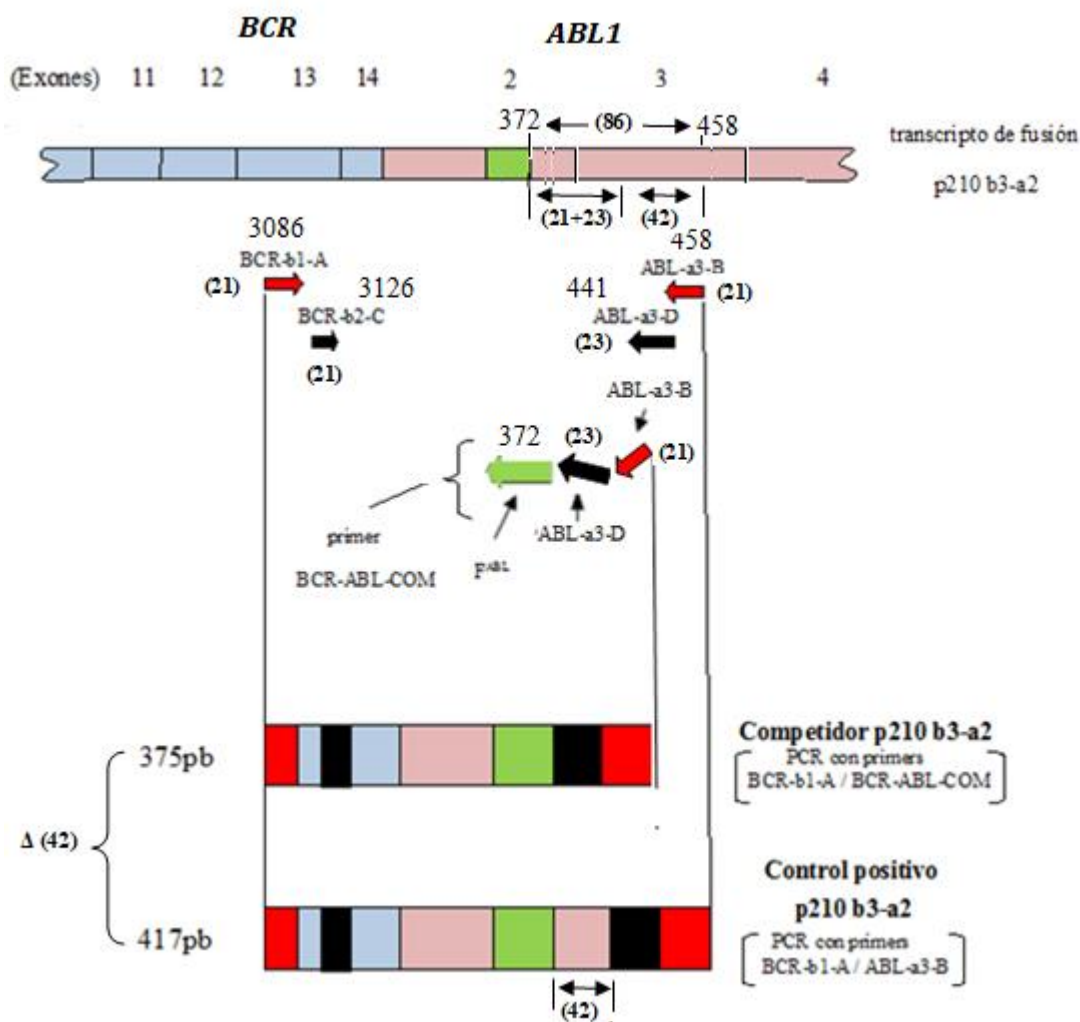


Figura 4.12. Generación de *Competidor p210 b3-a2*. Los números arriba de las flechas indican la posición del nucleótido 5' del primer. Nótese que el primer BCR-ABL-COM, usado para generar el *Competidor p210 b3-a2*, se anilló al molde específicamente a través de su secuencia F^{ABL} , generando un producto conteniendo las secuencias ABL-a3-B, ABL-a3-D y F^{ABL} unidas en forma contigua. Los siguientes ciclos de amplificación produjeron un amplicón con los mismos extremos que el amplicón p210 b3-a2, es decir, con secuencias externas para unión del juego de primers de la primera ronda de PCR, y secuencias internas para la unión del juego de primers de la segunda ronda de PCR. Se puede apreciar la diferencia de tamaño entre dicho *competidor* y el *Control Positivo p210 b3-a2*.

- *Competidor p210 b2-a2* (ver figura 4.13)

Se utilizó en la amplificación el siguiente juego de primers:

Primer directo

Primer reverso

BCR-b1-A

BCR-ABL-COM = ABL-a3-B_ABL-a3-D_^{F^{ABL}}

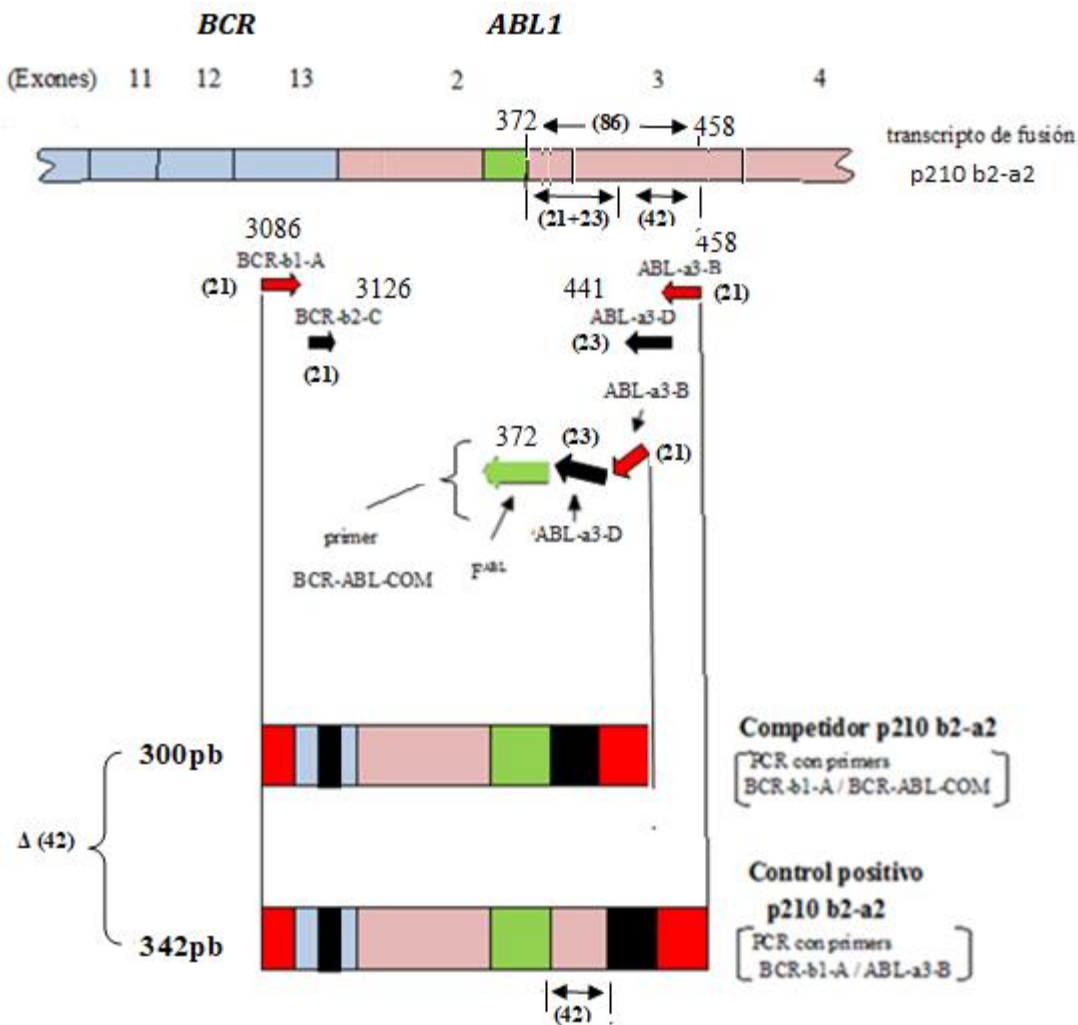


Figura 4.13. Generación de *Competidor p210 b2-a2*. Los números arriba de las flechas indican la posición del nucleótido 5' del primer. Nótese que el primer BCR-ABL-COM, usado para generar el *Competidor p210 b2-a2*, se anilló al molde específicamente a través de su secuencia F^{ABL}, generando un producto conteniendo las secuencias ABL-a3-B, ABL-a3-D y F^{ABL} unidas en forma contigua. Los siguientes ciclos de amplificación produjeron un amplicón con los mismos extremos que el amplicón p210 b2-a2, es decir, con secuencias externas para unión del juego de primers de la primera ronda de PCR, y secuencias internas para la unión del juego de primers de la segunda ronda de PCR. Se puede apreciar la diferencia de tamaño entre dicho *competidor* y el *Control Positivo p210 b2-a2*.

4.5.1.2. GENERACIÓN DE MOLÉCULA *COMPETIDOR ABLI*

También en este caso se adoptó la estrategia de construir una molécula de ADN “competidora” *ABL1* que genere un amplicón de menor tamaño que el generado por el transcripto *ABL1* cuando se usa el juego de primers ABL-UP/ABL-LOW. Para ello, se amplificó una muestra cADN de un paciente, usando como primer directo, ABL-UP, y como primer reverso, ABL-COM, el cual fue diseñado mediante el uso del programa “Primer Select”. La secuencia de nucleótidos de ABL-COM comenzó, en su extremo 5’, con la secuencia del primer reverso ABL-LOW, continuando con una secuencia F^{ABL-COM} del gen *ABL1* que hibrida 71 nucleótidos corriente arriba respecto de ABL-LOW (19), lográndose, con ello, una molécula que contiene las secuencias de unión de los primers ABL-UP y ABL-LOW, pero que es 50 pb más corta que la secuencia diana de tipo salvaje (véase figura 4.14).

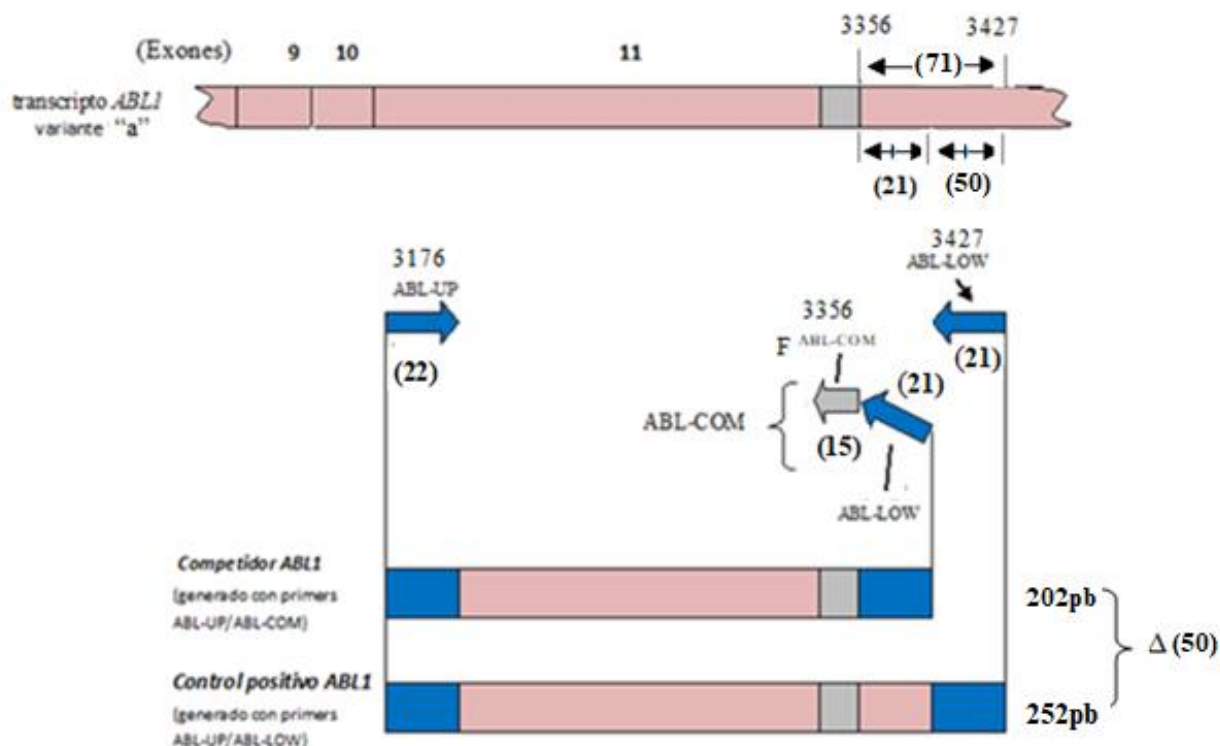


Figura 4.14. Generación del *Competidor ABL1*. Puede apreciarse la diferencia de tamaño entre el *Competidor ABL1* y el *Control Positivo ABL1*. Los números arriba de cada flecha (primer) se refieren a la posición del nucleótido (5') de cada primer. Los números entre paréntesis indican el tamaño (en nucleótidos) de los primers ó de secuencias. Nótese que el primer ABL-COM, usado para generar el *Competidor ABL1*, se anilló al molde específicamente solo a través de su secuencia F^{ABL-COM}, generando un producto conteniendo las secuencias ABL-LOW y F^{ABL-COM} unidas en forma contigua. Los siguientes ciclos de amplificación produjeron un amplicón con los mismos extremos ABL-UP/ABL-LOW que el amplicón *ABL1* de tipo salvaje.

4.5.3. CHEQUEO DE AMPLIFICACIONES Y CLONADO PARA GENERAR MOLÉCULAS COMPETIDORAS

4.5.3.1. *Competidor p190 e1-a2*

Como se puede observar en figura 4.15, se logró un producto amplificado del tamaño esperado para el competidor p190 e1-a2, sin generación de productos espúreos. Dicho producto de *PCR* fue utilizado posteriormente como inserto en la reacción de ligación con el vector plasmídico pGEM®-T Easy Vector. Esta reacción de ligación no fue exitosa.

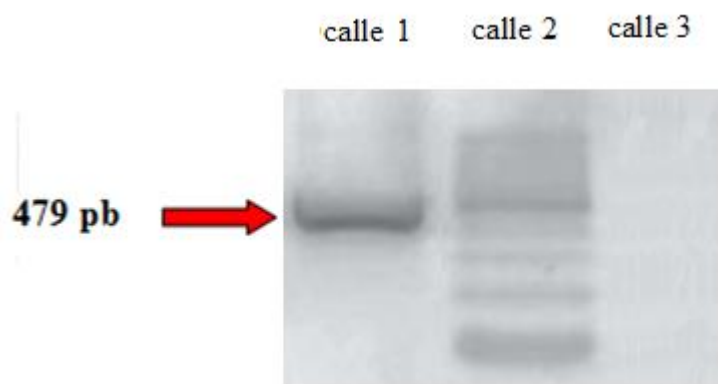


Figura 4.15. Fotografía de gel de agarosa 2 % correspondiente a electroforesis para chequeo de amplificación del *Competidor p190 e1-a2*. Calle 1: producto amplificado para generar molécula *Competidor p190 e1-a2* (479 pb). Calle 3: control negativo. Calle 2: marcador "100 bp DNA ladder" (Invitrogen).

4.5.3.2. *Competidor p210 b3-a2*

Como se puede observar en figura 4.16, se logró un producto amplificado del tamaño esperado para el competidor, el cual es comparado con el correspondiente control positivo en la calle vecina del gel. Dicho producto de *PCR* fue utilizado, posteriormente, como inserto en la reacción de ligación con el vector plasmídico pGEM®-T Easy Vector. Esta reacción de ligación no fue exitosa.

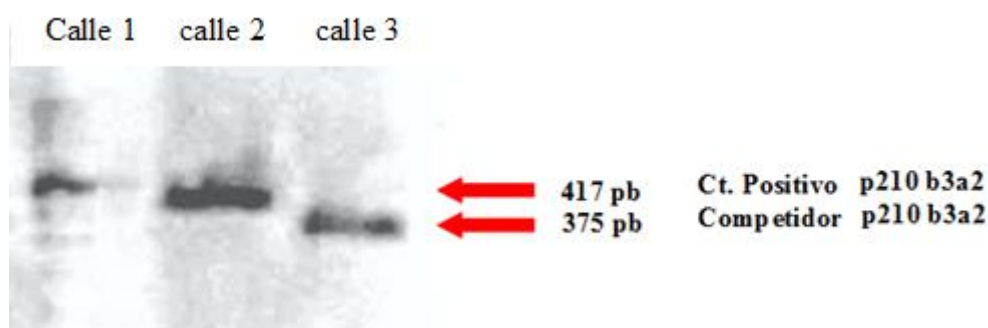


Figura 4.16. Fotografía de gel de agarosa 2 % correspondiente a electroforesis para chequeo de amplificación del *Competidor p210 b3-a2*. Calle 3: producto amplificado para generar la molécula *Competidor p210 b3-a2*. Calle 2: amplicón *Control Positivo p210 b3-a2*. Calle 1: marcador "100 bp DNA ladder" (Invitrogen).

4.5.3.3. *Competidor p210 b2-a2*

Como se puede observar en figura 4.17, se logró un producto amplificado del tamaño esperado para el competidor. Dicho producto de *PCR* fue utilizado, posteriormente, como inserto en la reacción de ligación con el vector plasmídico pGEM®-T Easy Vector. Esta reacción fue exitosa y generó la molécula *Competidor p210 b2-a2*.

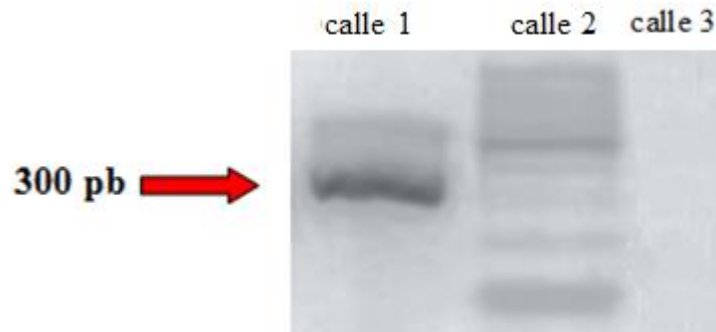


Figura 4.17. Fotografía de gel de agarosa 2 % correspondiente a electroforesis para chequeo de amplificación del *Competidor* p210 b2-a2. Calle 1: producto amplificado para generar la molécula *Competidor* p210 b2-a2 (300 pb). Calle 3: control negativo. Calle 2: marcador “100 bp DNA ladder” (Invitrogen).

4.5.3.4. *Competidor ABL1*

Como se puede observar en figura 4.18, se logró un producto amplificado del tamaño esperado para el competidor, sin generación de productos espúreos, el cual es comparado con el correspondiente control positivo en la calle vecina del gel. Dicho producto de *PCR* fue utilizado, posteriormente, como inserto en la reacción de ligación con el vector plasmídico pGEM®-T Easy Vector. Esta reacción fue exitosa y generó la molécula *Competidor ABL1* clonada.

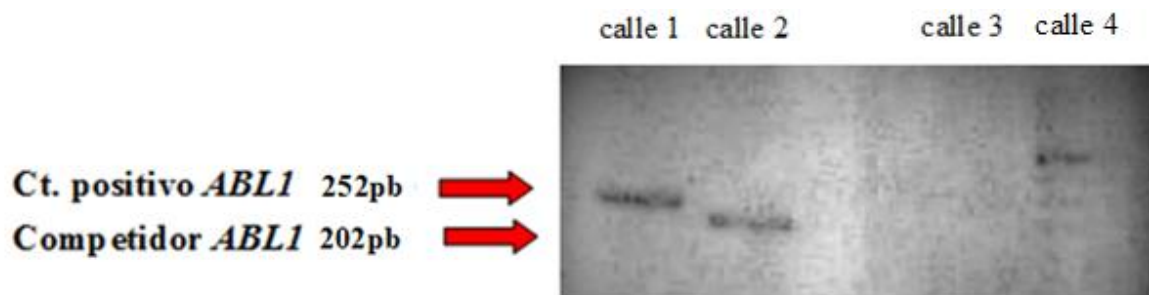


Figura 4.18. Fotografía de gel de agarosa 2 % correspondiente a electroforesis para chequeo de amplificación del *Competidor ABL1*. Calle 1: amplicón *ABL1* (252 pb). Calle 2: producto amplificado para generar la molécula *Competidor ABL1* (202 pb). Calle 3: control negativo de amplificación del competidor *ABL1*. Calle 4: marcador “100 bp DNA ladder” (Invitrogen).

4.5.4. Resumen de resultados de clonado de competidores

Se clonaron exitosamente:

- *Competidor ABL1*
- *Competidor p210 b2-a2*

No se lograron clonar:

- *Competidor p210 b3-a2*
- *Competidor p190 e1-a2*

4.6. CHEQUEO DE TODOS LOS CLONES PURIFICADOS

Para confirmar que los clones purificados contuvieran el inserto adecuado, se efectuó una amplificación por *PCR* de ADN plasmídico obtenido de cada clon mediante la técnica de “Purificación de plásmidos” descrita en Materiales y Métodos. Para cada par “*Control Positivo*”/”*Competidor*” respectivo, se usaron las mismas condiciones de reacción que para la primera ronda de *PCR* en la detección del transcripto en cuestión. En figura 4.19 se aprecia que los tamaños de los amplicones obtenidos son los esperados para cada uno.

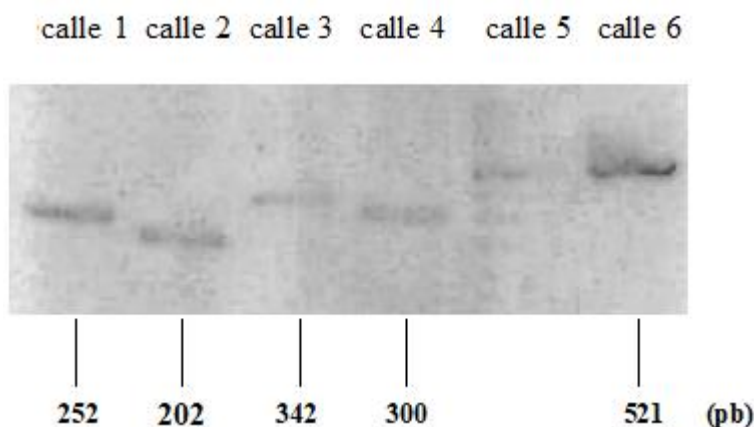


Figura 4.19. Fotografía de gel de agarosa 2 % correspondiente a electroforesis para chequeo de amplificación de los “controles positivos” y “competidores” clonados y purificados. Calle 1: amplicón *ABL1*. Calle 2: amplicón *Competidor ABL1*. Calle 3: amplicón *Control Positivo b2-a2*. Calle 4: amplicón *Competidor b2-a2*. Calle 6: amplicón *Control Positivo e1-a2*. Calle 5: marcador “100 bp DNA ladder” (Invitrogen).

4.8. DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se logró implementar un sistema de *detección* de transcritos *BCR-ABL1* mediante *RT-PCR anidada*. Ya se puede comenzar a estudiar la sensibilidad y precisión del sistema para los transcritos p190 e1-a2 y p210 b2-a2, cuyos controles positivos clonados ya se lograron purificar. La sensibilidad y precisión del sistema para el transcrito p210 b3-a2 no se podrá estudiar hasta no contar con el *Control Positivo* p210 b3-a2 clonado y purificado, el cual es necesario para el estudio.
- Se lograron objetivos parcialmente en la creación de un sistema de *cuantificación* de transcritos *BCR-ABL1*. Restan clonar tres fragmentos amplificados: *Competidor* p190 e1-a2, *Control positivo* p210 b3-a2 y *Competidor* p210 b3-a2. Una probable explicación de este fracaso puede ser la degradación del residuo de adenina del extremo 3' agregada por la Taq polimerasa a cada fragmento amplificado y/o la degradación del residuo de timina del extremo 3' del plásmido usado para clonar, lo

cual pudo haber imposibilitado las reacciones de ligación entre el inserto y el vector plasmídico. Dado que se cuenta con los *Controles positivos* p210 b2-a2 y *ABL1*, y los *Competidores* p210 b2-a2 y *ABL1* ya clonados y purificados, se puede comenzar a estudiar la sensibilidad y precisión del sistema de cuantificación de transcritos *BCR-ABL1* p210 b2-a2 por *RT-PCR anidada competitiva*.

CAPÍTULO 5

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO 5

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- van Dongen, J. J. M., Macintyre, E. A., Gabert, J. A., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., Gottardis, E., Rambaldi, A., Dotti, G., Griesinger, F., Parreira, A., Gameiro, P., González Díaz, M., Malec, M., Langerak, A. W., San Miguel, J. F. & Biondi, A. (1999) Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*, 13, 1901-1928

2- Olavarria, E. Kanfer, E., Szydlo, R., Kaeda, J., Rezvani, K., Cwynarski, K., Pocock, C., Dazzi, F., Craddock, C., Apperley, J. F., Cross, N. C. & Goldman, J. M. (2001) Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 97, 1560-1565

3- Otazu, I. B., Tavares, R. B., Hassan, R., Zalcberg, I., Tabak, D. G. & Seuánez, H. N. (2002) Estimations of BCR-ABL/ABL transcripts by quantitative PCR in chronic myeloid leukaemia after allogeneic bone marrow transplantation and donor lymphocyte infusion. *Leukemia Research*, 26, 129-141

4- Moravcová, J., Zmeková, V., Klamová, H., Voglová, J., Faber, E., Michalová, K., Rabasová, J. & Jarosová, M. (2004) Differences and similarities in kinetics of BCR-ABL transcript levels in CML patients treated with imatinib mesylate for chronic or accelerated disease phase. *Leukemia Research*, 28, 415-419

5- Asnafi, V., Rubio, M. T., Delabesse, E., Villar, E., Davi, F., Damaj, G., Hirsch, I., Dhedin, N., Vernant, J. P., Varet, B., Buzyn, A. & Macintyre, E. (2006). Prediction of relapse by dat 100 BCR-ABL quantification after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 20, 793-799

- 6- Huguesa, T. & Branforda, S. (2006). Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. *Blood Reviews*, 20, 29-41
- 7- Hochhaus, A., Reiter, A., Saußebe, S., Reichert, A., Emig, M., Kaeda, J., Schultheis, B., Berger, U., Shepherd, P. C. A., Allan, N. C., Hehlmann, R., Goldman J. M. & Cross, N. C. P. (2000) Molecular heterogeneity in complete cytogenetic responders after interferon- α therapy for chronic myelogenous leukemia: low levels of minimal residual disease are associated with continuing remission. *Blood*, 95, 62-66
- 8- Virgili, A., Brazma, D., Reid, A. G., Howard-Reeves, J., Valgañón, M., Chanalaris, A., De Melo, V. A. S., Marin, D., Apperley, J. F., Grace, C. & Nacheva, E. P. (2008) FISH mapping of Philadelphia negative *BCR/ABL1* positive CML. *Mol. Cytogenet.*, 1: 14
- 9- Chasseriau, J., Rivet, J., Bilan, F., Chomel, J. C., Guilhot, F., Bourmeyster, N. & Kitzis, A. (2004) Characterization of the Different BCR-ABL Transcripts with a Single Multiplex RT-PCR. *J. Mol. Diagn.*, 6(4), 343–347
- 10- Angstreich, G. R., Smith, B. D. & Jones, R. J. (2004) Treatment options for chronic myeloid leukemia: imatinib versus interferon versus allogeneic transplant. *Curr. Opin. Oncol.*, 16, 95-9
- 11- Matsushita, M., Ozawa, K., Suzuki, T., Nakamura, M., Nakano, N., Kanchi, S., Ichikawa, D., Matsuki, E., Sakurai, M., Karigane, D., Kasahara, H., Tsukamoto, N., Shimizu, T., Mori, T., Nakajima, H., Okamoto, S., Kawakami, Y. & Hattori, Y. (2017) CXorf48 is a potential therapeutic target for achieving treatment-free remission in CML patients. *Blood Cancer Journal* 7(9):e601.
- 12- Wang, Y. L., Lee, J. W., Cesarman, E., Jin, D. K. & Csernus, B. (2006) Molecular Monitoring of Chronic Myelogenous Leukemia: Identification of the Most Suitable Internal Control Gene for Real-Time Quantification of *BCR-ABL* Transcripts. *J. Mol. Diagn.*, 8(2): 231–239.
- 13- Larripa, I., Ruiz, M. S., Gutiérrez, M. & Bianchini, M. (2017) Recomendaciones metodológicas para el monitoreo molecular BCR-ABL1 en pacientes con leucemia mieloide crónica por PCR cuantitativa en tiempo real. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 77, 61-72.

14- Siebert, P. D. (1999) Quantitative RT-PCR. *Methods in Molecular Medicine*, Vol 26: Quantitative PCR protocols (Editado por: Kochanowski, B. & Reischl, U), pp. 61-85. © Humana Press Inc., Totowa, NJ

15- Cross, N. C. P., Feng, L., Chase, A., Bungey, J., Hughes, T. P. & Goldman, J. M. (1993) Competitive Polymerase Chain Reaction to Estimate the Number of BCR-ABL Transcripts in Chronic Myeloid Leukemia Patients After Bone Marrow Transplantation. *Blood*, 82, 1929-1936

16- Martinelli, G., Testoni, N., Montefusco, V., Amabile, M., Saglio, G., Ottabiani, E., Terragna, C., Bonifazzi, F., De Vivo, A., Pane, F., Rosti, G. & Tura, S. (1998) Detection of bcr-abl transcript in chronic myelogenous leukemia patients by reverse-transcription-polymerase chain reaction and capillary electrophoresis. *Haematologica*, 83, 593-601

17- PROMEGA (2007) Pgem®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual. <https://www.med.upenn.edu/robertsonlab/assets/user-content/documents/pGEM-T%20and%20pGEM-T%20Easy%20Vector%20Systems.pdf>. Consultado en Marzo, 2008.

18- Goode, T., Ho, W. Z., O'Connor, T., Busted, S., Douglas, S. D., Shanahan, F. & O'Conn, J. (2002) Nested RT-PCR: Sensitivity Controls are Essential to Determine the Biological Significance of Detected mRNA. *Methods in Molecular Biology*, vol. 193: RT-PCR Protocols (Editado por: O'Connell, J.), pp. 65-79. © Humana Press Inc., Totowa, NJ

19- NCBI, Gene ID: 25. ABL1: ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase [Homo sapiens (human)]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=25>