

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS

**Detección y Caracterización Molecular del Punto
Fusión BCR-ABL en Individuos Leucémicos *Ph(+)***

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
PRESENTA**

QFB. LIZBETH MARIELA CERÓN RAMÍREZ

Tijuana, Baja California.

Enero de 2009.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA
de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

Bajo la Tutoría y Dirección del
DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento de la
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
[8ª Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación]

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California por la oportunidad brindada.

A mi familia por su cariño y apoyo incondicional, no sólo en este proyecto sino en todo el trayecto de mi vida.

A mi gran amiga, por tu incondicional apoyo, compañía, cariño, paciencia y todas tus enseñanzas, gracias por seguir conmigo en cada paso.

A mi gran amor por estar a mi lado todo este tiempo; ayudándome a luchar día con día, gracias por tu comprensión, paciencia, apoyo, y fé, pero sobre todo por tu fuerza y tu amor.

A mis maestros,

Dr. Alexei Licea, por dedicarme de su tiempo, compartir su conocimiento, por su amistad y cariño para la realización de este proyecto.

Dr. Manuel Cornejo, por sus sugerencias, paciencia, conocimiento y por tu amistad.

Dr. Samuel Meléndez, por su dedicación hacia este proyecto, sus consejos y apoyo.

M.C. Rosy Mares quien además de asesorar directamente este proyecto, ha sido una gran amiga, gracias por todos tus consejos y ayuda.

Un agradecimiento en particular al Dr. Marco Ramos, porque además de ser el director de esta tesis, ha sido un gran amigo, gracias por tu calidad humana, por todo el apoyo brindado, por creer en mí y por seguir siendo mi gran maestro.

A mis compañeros Joaquín, Roberto, Paty y Paloma por todo su apoyo.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN	6
I. INTRODUCCION	7
I.1. Situación de las leucemias en México	7
I.2. Leucemias	8
I.2.1. Clasificación.....	8
1.2.2. Análisis genético	10
I.3. Cromosoma Filadelfia (<i>Ph</i>) y la fusión génica <i>bcr-abl</i>	11
Figura 1. Representación esquemática tanto de los genes <i>abl</i> y <i>bcr</i> en humanos como de las fusiones <i>bcr-abl</i> más comunes en leucemias <i>Ph</i> (+).	12
Tabla 1. Caracterización molecular del punto de fusión <i>bcr-abl</i> reportados en el NCBI <i>GenBank</i> TM	13
I.4. BCR-ABL: la proteína oncogénica	13
I.5. Leucemias <i>Ph</i> (+)	14
I.6. Justificación	16
II. OBJETIVOS.....	17
II.1. Objetivo General.....	17
II.2. Objetivos Específicos	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
III.1. Oligonucleótidos.....	18

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las fusiones génicas <i>bcr-abl</i> mayor (M) y menor (m).	18
III.2. Muestras sanguíneas <i>Ph</i> (+)	19
III.3. Extracción y purificación de ARN	19
III.4. Síntesis de la primera cadena de ADN complementario.....	20
III.5. Amplificación por PCR.....	21
Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR inicial para la amplificación de un fragmento de la fusión <i>bcr-abl</i>	21
Tabla 4. Componentes de la reacción de PCR anidado para la amplificación de un fragmento de la fusión <i>bcr-abl</i>	22
III.6. Fosforilación y reparación de los productos de PCR.....	22
III.7. Preparación del vector <i>pBluescript</i> SK- para clonar extremos romos	23
III.8. Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa	24
III.9. Ligación de fragmentos de ADN	24
III.10. Transformación bacteriana y selección de transformantes estables	25
III.11. Purificación rápida de plásmidos.....	26
III.12. Análisis de restricción de los plásmidos recombinantes	27
III.13. Purificación de plásmidos a alta pureza.....	27
III.14. Secuenciación de ADN	28
III.15. Análisis bioinformático de secuencias de ADN	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	30
IV.1. RT-PCR para amplificar fragmentos de la fusión <i>bcr-abl</i>	30

Tabla 5. Algunos de los productos de la fusión <i>bcr-abl</i> reportados en la base de datos del NCBI <i>GenBank</i> TM	31
IV.2. Detección molecular de la fusión <i>bcr-abl</i> mayor	32
Figura 2. Separación de los productos de PCR anidado de la fusión <i>bcr-abl</i> mayor.	32
Figura 3. Separación de los productos de PCR anidado de la fusión <i>bcr-abl</i> menor de la muestra 03.	33
IV.3. Detección molecular de la fusión <i>bcr-abl</i> menor	33
IV.4. Caracterización molecular del punto de fusión <i>bcr-abl</i>	34
Figura 4. Secuencia nucleotídica y polipeptídica del producto de amplificación <i>bcr-abl</i> mayor obtenido a partir de la reacción de RT-PCR anidado de las muestras 01–03.....	34
Figura 5. Secuencia nucleotídica y polipeptídica del producto de amplificación <i>bcr-abl</i> menor obtenido a partir de la reacción de RT-PCR anidado de la muestra 03.	35
IV.5. Participación de las secuencias repetitivas Alu en la formación de t(9;22).....	36
V. CONCLUSIONES	38
VI. BIBLIOGRAFIA.....	39

RESUMEN

La leucemia mieloblástica presenta (en su gran mayoría) la translocación t(9;22), la cual se caracteriza citogenéticamente por la presencia del cromosoma “Filadelfia (*Ph*)”. Este cromosoma anormal genera la fusión del gen constitutivo *bcr* (presente en el cromosoma 9) con el *proto*-oncogen *c-abl* (presente en el cromosoma 22), dando como resultado la fusión *bcr-abl*, y la expresión de su producto génico (la proteína BCR-ABL).

La expresión de BCR-ABL provoca la desregulación de varias funciones y vías de señalización celulares, ocasionando la patología. Hasta el momento, se han caracterizado tres variantes de la fusión génica *bcr-abl*, denominadas mayor, menor y micro, respectivamente. Todas estas variantes, a pesar de ser de mal pronóstico, presentan ciertas diferencias en la respuesta al tratamiento, lo que hace importante conocer y caracterizar su punto de unión.

En el presente trabajo se realizó el análisis y la caracterización molecular de la fusión génica *bcr-abl* de células malignas de tres individuos leucémicos con diagnóstico citogenético *Ph*(+). El transcrito de *bcr-abl* fue detectado y amplificado mediante la técnica de RT-PCR. Los productos obtenidos fueron clonados y secuenciados. Los resultados del análisis bioinformático de la secuencia nucleotídica y polipeptídica deducida, indican que las tres muestras analizadas expresan la fusión *bcr-abl* mayor, variante b2a2.

I. INTRODUCCION

I.1. Situación de las leucemias en México

El cáncer es un padecimiento complejo y multifactorial, del cual diversos estudios y registros han revelado su magnitud y gravedad, ubicándolo como uno de los principales problemas de salud en todo el mundo [OMS, 2000].

En México, los registros nacionales señalan que los tumores malignos son una de las principales causas de mortalidad en edad productiva y *post*-productiva. En mujeres, las principales causas de morbilidad por neoplasias malignas son cáncer de mama, de útero y leucemias; en tanto que en hombres, destacan las leucemias, el cáncer de traquea-bronquios-pulmón, de estómago y de colon [RHNM, 2000].

Por otro lado, la mortalidad infantil por neoplasias fue dividida por grupos de edad: quinta causa de muerte (6.1%) en niños de 1-4 años (54% por leucemias) y segunda causa de muerte (15.1%) en niños de 5-14 años (57.6% por leucemias). Resulta evidente que las leucemias son un grupo de neoplasias común en la población mexicana [SSA, 2002].

Las leucemias son un tipo de neoplasia común, tanto en niños como en adultos, caracterizadas por la proliferación anormal y acumulación de células inmaduras de la sangre. La leucemia mielogénica crónica fue la primera enfermedad maligna en la que se demostró una alteración genética y es, actualmente, el modelo de leucemia mejor estudiado a nivel molecular [Besses Raebel, 2002].

El creciente conocimiento de los diversos eventos moleculares que intervienen en las leucemias ha estimulado la búsqueda de agentes terapéuticos que puedan actuar sobre éstos e inhibir la proliferación de las células malignas [Kurtzberg, 1997].

En nuestra realidad social actual, los servicios de salud que están a nuestro alcance no cuentan con el suficiente apoyo diagnóstico en las etapas tempranas de la enfermedad y en las etapas posteriores al tratamiento (monitoreo), lo cual repercute directamente en el porcentaje de supervivencia de los pacientes. Así pues, es de gran relevancia el conocimiento y la comprensión del comportamiento biológico de la enfermedad, de manera que éstos conduzcan hacia nuevas alternativas de diagnóstico, tratamiento y pronóstico [AMP, 2003].

1.2. Leucemias

1.2.1. Clasificación

Las neoplasias infantiles forman parte de una pequeña proporción de todos los casos de cáncer, a nivel poblacional; sin embargo, comprender la oncogénesis y la evolución de la terapia anti-cancerígena, tendría un gran impacto por su contribución relativa a la mortalidad infantil [Smith, 2002]. Además, el impacto sociológico de las neoplasias infantiles es mucho más fuerte, ya que regularmente deshace la vida familiar y potencialmente puede ocasionar la pérdida de varios años de vida productiva de los individuos [Rivera Luna, 2000].

Las leucemias son desórdenes mielo-proliferativos con una expansión clonal de células hematopoyéticas transformadas, debido a la alteración de una clona celular que

surge de un progenitor hematopoyético y que, finalmente, origina un estado de insuficiencia medular: las células malignas reemplazan al tejido hematopoyético normal en la médula ósea y se infiltran hacia ganglios linfáticos, bazo, hígado y otros órganos. La célula predominante en medula ósea y sangre periférica se puede identificar como *blasto* [Besses Raebel, 2002].

De acuerdo a la clasificación de la OMS, las neoplasias hematológicas se dividen según la línea celular afectada: mieloides, linfoides, mastoides o histiocíticas. En cada categoría, las diferentes enfermedades se definen de acuerdo a una combinación de manifestaciones morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y datos clínicos específicos. Sin embargo, la clasificación más prevalente se basa en el tipo de proliferación celular y el diagnóstico/pronóstico del padecimiento: linfoblástica o mieloblástica y aguda ó crónica (identificadas comúnmente como LLA, LLC, LMC y LMA, respectivamente) [Piedras, 2000].

Cuando la leucemia no es tratada a tiempo, la supervivencia puede ser corta; sin embargo, con el reciente desarrollo de mejores métodos de diagnóstico y de regímenes terapéuticos correctamente diseñados, la mayoría de los leucémicos entran en un periodo de remisión prolongada y, al parecer, muchos se curan [Rivera Luna, 2000].

El diseño del tratamiento basado en el riesgo requiere de la disponibilidad de factores pronósticos que consistentemente predigan un efecto exitoso. Para algunas leucemias (como LLA infantil), los datos clínicos y de laboratorio, tales como la cuenta de glóbulos blancos, la morfología celular, el inmunofenotipo, la citogenética, el número de cromosomas y la detección molecular de translocaciones cromosómicas recurrentes han demostrado tener valor pronóstico [CancerWEB].

1.2.2. Análisis genético

El análisis citogenético de las células malignas y la detección molecular de algunas alteraciones cromosómicas recurrentes, correlaciona específicamente con distintos tipos de neoplasias hematológicas, lo cuál proporciona una valiosa información con aplicaciones clínicas y terapéuticas significativas. Algunas alteraciones cromosómicas, como las translocaciones, son detectadas comúnmente en un alto número de casos de individuos leucémicos; lo cuál representa un buen biomarcador de uso clínico [Hjalgrim, 2002].

El análisis molecular de las anormalidades citogenéticas ha permitido identificar a los genes involucrados en la transformación neoplásica. Además de su localización, en muchos casos también se conoce su función, lo cual ha permitido obtener evidencia de su participación en la transformación celular.

Desde la década de 1980's, varios métodos moleculares han favorecido, progresivamente a la identificación de alteraciones genéticas asociadas a leucemias. De gran utilidad han sido algunas metodologías, tales como la hibridación tipo *Southern blot*, la hibridación in situ fluorescente o *FISH* (del inglés *Fluorescent In Situ Hybridisation*), y la reacción en cadena de la polimerasa o *PCR* (del inglés *Polymerase Chain Reaction*). La inclusión de estas técnicas moleculares ha permitido mejorar la certeza del diagnóstico. Esto es, ha sido posible detectar translocaciones que habitualmente no son identificadas por los análisis citogenéticos de rutina, e incluso distinguir lesiones cromosómicas que aparentemente son idénticas, pero difieren a nivel molecular [Marín, 2001].

De esta manera, el desarrollo e implementación de metodologías que permitan la detección molecular, simple o múltiple, de los productos de expresión de fusiones génicas presentes en individuos leucémicos es de gran importancia para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la enfermedad [Romero-Guzmán, 2002].

1.3. Cromosoma Filadelfia (Ph) y la fusión génica bcr-abl

Algunas leucemias presentan la translocación t(9;22), comúnmente llamada cromosoma Filadelfia (*Ph*). Este cromosoma anormal produce la fusión del gen constitutivo *bcr* (del cromosoma 9) con el *proto*-oncogen *abl* (del cromosoma 22). La expresión de la proteína de fusión BCR-ABL provoca la desregulación de varias funciones y vías de señalización, ocasionando la enfermedad. Los detalles que asocian a los mecanismos o fenómenos genotóxicos de la fusión *bcr-abl* con los procesos leucémicos aún no son claramente conocidos, pero ésta se observa en un gran número de casos de leucemias [Satake, 2008].

El gen *abl* humano (por su semejanza con el gen de la leucemia murina de *Abelson*) codifica para una tirosina-cinasa cuya actividad se encuentra estrictamente regulada. Este gen se expresa como una proteína de 145 KDa, con 2 isoformas que surgen de la recombinación del primer exón. La proteína ABL se caracteriza por la presencia de 3 dominios SRC, donde el dominio SH1 tiene la función de tirosina-cinasa. Al parecer, ABL participa en la modulación e integración de señales que influyen en el ciclo celular y la apoptosis.

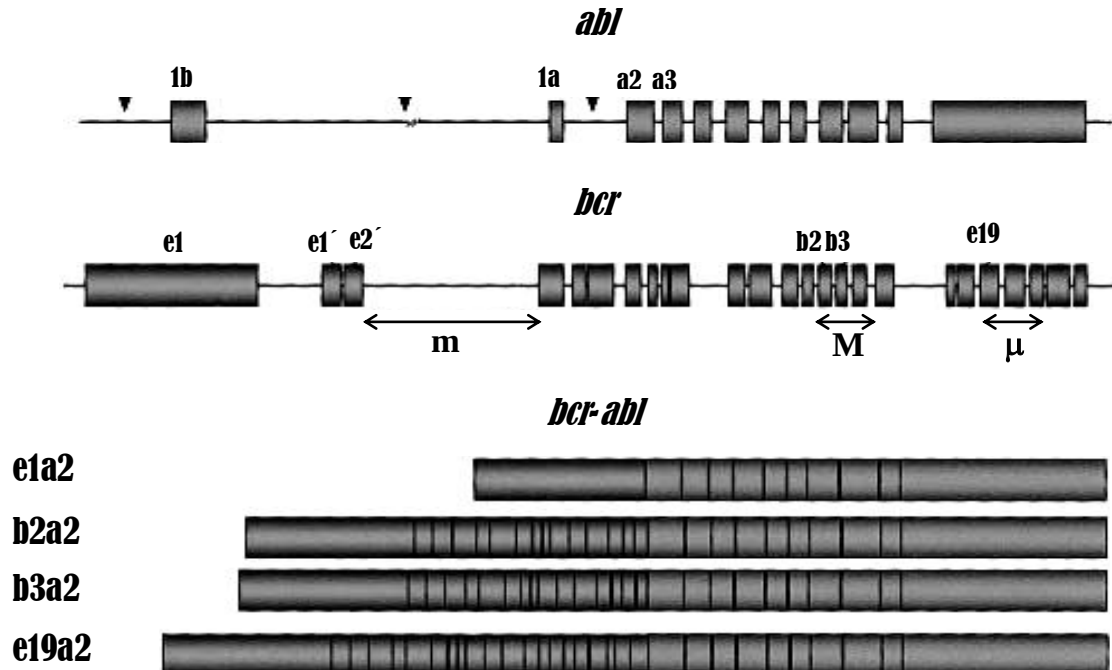


Figura 1. Representación esquemática tanto de los genes *abl* y *bcr* en humanos como de las fusiones *bcr-abl* más comunes en leucemias *Ph*(+).

En la parte superior se muestran los genes *abl* y *bcr* resaltando los exones primordialmente implicados en las fusiones génicas. En tanto que los transcritos maduros obtenidos después del mecanismo de “*splicing*” se observan en la parte inferior.

El gen *bcr* humano (del inglés *breakpoint cluster region*) codifica para una proteína de 160 KDa, cuyo exón inicial codifica para serina/treonina cinasa (amino terminal). La proteína se estructura en forma de dímero a través de su extremo amino terminal. Además, puede ser fosforilada en diferentes residuos de tirosina para la activación de otras señales intracelulares.

En la translocación t(9;22) ambos genes son truncados, generando dos fusiones génicas: *bcr-abl* en el cromosoma 22q (cromosoma *Ph*) y *abl-bcr* en el cromosoma 9q+ (hasta el momento no se ha detectado alguna importancia funcional) (véase la Figura 1). La fusión *bcr-abl* produce la expresión constitutiva de un ARN mensajero que codifica

para una tirosina-cinasa citoplásmica activa. La Tabla 1 muestra algunos de los puntos de la fusión génica que han sido caracterizados molecularmente.

1.4. BCR-ABL: la proteína oncogénica

La proteína de fusión BCR-ABL es una tirosina-cinasa citoplásmica que, gracias a que su actividad de cinasa está desregulada e incrementada, puede fosforilar diversos sustratos y activar múltiples vías de transducción de señales, afectando el crecimiento y diferenciación celular. Los sustratos de BCR-ABL son diversos, de manera que interviene (directa o indirectamente) en eventos de transformación, crecimiento o muerte celular programada.

Como la señal proporcionada por BCR-ABL es constitutiva, las células que la poseen escapan del control normal del crecimiento y se tornan neoplásicas. Los mecanismos propuestos para la transformación hacia un fenotipo leucémico son:

- (1) alteración de la adhesión al estroma, lo cual por sí solo puede ocasionar la pérdida de la regulación negativa de la proliferación celular;

Tabla 1. Caracterización molecular del punto de fusión *bcr-abl* reportados en el NCBI *GenBank*TM.

	Tipo	GenBank TM	Fusión molecular (<i>bcr-abl</i>)
Menor (m)	e1a2	AF113911	ggagacgcagaagcccttc
Mayor (M)	b2a2	AJ131467	aataaggaagaagcccttc
Mayor (M)	b3a2	AJ131466	cagagttcaaagcccttc

- (2) activación de la señales mitogénicas, a través de diferentes vías, tales como las de la cinasa MAP y *Ras*, las cuales pueden activar también a Myc, Jak-Stat y PI3;
- (3) inhibición de la apoptosis, críticamente dependiente de la actividad de tirosina-cinasa y de la actividad de *Ras*. Así como de varias otras vías de señalización, entre ellas la de la familia de *bcl-2*.

Como resultado de lo anterior, la actividad constitutiva de tirosina-cinasa inicia una cascada de señales que conducen al aumento de la proliferación y la supresión apoptótica con mantenimiento del proceso de diferenciación, lo cual permite explicar el fenotipo leucémico.

I.5. Leucemias Ph(+)

La presencia del cromosoma *Ph*, o translocación t(9;22), es la principal característica citogenética de aprox. 95% de los casos de leucemia mieloblástica crónica (LMC) y de un 5-20% de los casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA).

Como se mencionó anteriormente (Figura 1 y Tabla 1), la fusión génica *bcr-abl* puede presentar 3 variantes: mayor, menor o micro; las cuales, a pesar de ser de mal pronóstico (debido sus capacidades transformantes), presentan ciertas diferencias en la respuesta al tratamiento.

El segmento del gen *abl* en la fusión es el mismo, sólo difiere ligeramente en el punto de ruptura y unión con el gen *bcr*, el cual puede ocurrir en los exones 1b o 1a, y más frecuentemente, entre ambos. De tal manera que, en la fusión *bcr-abl* siempre estará presente el exón a2 y el resto del gen *abl* [Pallisgard, 1998].

Sin embargo, dependiendo del sitio de ruptura del gen *bcr*, el producto de fusión BCR-ABL varía en su tamaño (185 a 230 KDa). Hasta el momento se han descrito claramente 3 sitios de ruptura (véase Figura 1):

Mayor (o principal): Se observa primordialmente en LMC y en un 25% de LLA *Ph*(+). La ruptura sucede entre los exones 12-16 (b1-b5) de *bcr*; primordialmente, el exón b2 o b3 se fusiona con el exón a2 de *abl*, formando la fusión b2a2 o b3a2. La proteína resultante BCR-ABL es de 210 KDa (p210).

Menor: Sucede en el restante 75% de LLA *Ph*(+) y rara vez en la LMC. Comúnmente, la ruptura sucede entre los exones e2' y e2 de *bcr*, rindiendo la fusión e1a2, que codifica una proteína BCR-ABL de 185-190 KDa (p190).

Micro: Recientemente descrita, sucede hacia el exón 19 de *bcr* y codifica para una proteína de 230 KDa (p230). Se vincula a la rara variedad de leucemia neutrofílica crónica *Ph*(+).

La presencia de BCR-ABL en pacientes con LLA usualmente indica pronóstico pobre y de alto riesgo, lo que justifica un trasplante de médula ósea. Además, la detección de células malignas residuales *Ph*(+) después de un periodo de quimioterapia o de un trasplante de médula ósea es crítica y tiene implicaciones terapéuticas relevantes: tanto los niveles del ARN mensajero como del polipéptido BCR-ABL en individuos leucémicos correlacionan con la actividad de clones malignas y pueden predecir un relapso inminente. Por lo tanto, la detección oportuna de este marcador leucémico es útil en la toma de decisiones clínicas y terapéuticas.

En el presente trabajo se presenta la detección molecular de la fusión *bcr-abl* en tres individuos leucémicos *Ph*(+) mediante el uso de la técnica RT-PCR. Adicionalmente,

se realizó la caracterización del punto de unión en la fusión, mediante otras técnicas moleculares (como la secuenciación de ADN). La instrumentación de esta metodología como rutina de laboratorio puede ser útil tanto para el diagnóstico de la enfermedad como para el seguimiento de individuos con leucemia *Ph(+)* (enfermedad mínima residual) mediante su comparación con otras translocaciones y rearrreglos cromosómicos [Pallisgard, 1998]

1.6. Justificación

Actualmente, existe la necesidad de desarrollar e implementar técnicas de genética molecular que apoyen al diagnóstico clínico, que tengan valor pronóstico o que orienten la prescripción terapéutica hacia un tratamiento seguro, específico y eficaz. Además, existe una carencia en recursos humanos con conocimientos, habilidades y destrezas capaces de prestar servicios de diagnóstico onco-hematológico.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo General

Identificar la fusión génica *bcr-abl* (mayor o menor) en células malignas de pacientes leucémicos *Ph(+)* mediante métodos de biología molecular.

II.2. Objetivos Específicos

1. Utilizando un estuche comercial, aislar el ARN total a partir de muestras sanguíneas de pacientes con leucemia *Ph(+)*.
2. Detectar la fusión *bcr-abl* (mayor o menor) mediante la técnica RT-PCR anidado.
3. Introducir los fragmentos *bcr-abl* amplificados en un vector de clonación mediante un procedimiento estándar de ligación de productos de PCR.
4. Obtener la secuencia nucleotídica de los fragmentos *bcr-abl* clonados utilizando los servicios de secuenciación automática de ADN.
5. Mediante búsquedas comparativas y un análisis bioinformático, caracterizar el punto de unión molecular entre los cromosomas 9 y 22 que dieron origen a la fusión *bcr-abl* identificada.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Oligonucleótidos

Para amplificar las variantes *bcr-abl* mayor o menor se utilizó un grupo de oligonucleótidos reportados en la literatura [Pallisgard, 1998] (véase la Tabla 2).

Las propiedades fisicoquímicas de los oligonucleótidos fueron analizadas utilizando el programa OLIGO[®] v4.0 para Mac (*Molecular Biology Insights, Inc.*). La especificidad fue verificada mediante un análisis tipo *BLAST* usando la base de datos *GenBank*[™] del Centro Nacional de Información en Biotecnología de los E.U.A. (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov).

Los oligonucleótidos sintéticos fueron comprados a la compañía *Bio-Synthesis*, representada por *Sigma-Aldrich* de México.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las fusiones génicas *bcr-abl* mayor (M) y menor (m).

La última columna muestra en que etapa se utilizó cada oligonucleótido.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Fusión	PCR
BCR1698U19.LC	CGCTCTCCCTCGCAGAACT	m	inicial
ABL661L20.LC	TTTTGGTTTGGGCTTCACAC	M/m	inicial
BCR3060U23.LC	GAGTCACTGCTGCTGCTTATGTC	M	inicial
BCR1777U19.LC	ACTGCCCCGGTTGTCGTGTC	m	anidado
ABL642L23.LC	ACACCATTCCCCATTGTGATTAT	M/m	anidado
BCR3128U22.LC	CACGTTCTGATCTCCTCTGAC	M	anidado

III.2. Muestras sanguíneas Ph(+)

Las muestras sanguíneas *Ph*(+) utilizadas en este estudio fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Miguel Guerra (HAIMA, Tijuana). Las muestras provienen de 3 pacientes (voluntarios para el estudio) con diagnóstico de leucemia *Ph*(+). Al momento del estudio, dos de ellos se encontraban en fase crónica y el otro en remisión. El cromosoma *Ph* fue diagnosticado previamente empleando las técnicas citogenéticas habituales.

5 mL de sangre periférica total fueron obtenidos mediante punción venosa. Las muestras fueron colectadas en tubos con EDTA como anticoagulante (*Becton Dickinson*). Como control negativo para el estudio, se utilizó una muestra de sangre de un donador voluntario sano.

III.3. Extracción y purificación de ARN

Para la purificación de ARN, se utilizó el estuche comercial *QIAampTM RNA Blood Mini Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Es importante recordar que todos los reactivos, soluciones y material utilizados fueron preparados exclusivamente para manejo de ARN, siguiendo las recomendaciones de los procedimientos estándar de laboratorio [Sambrook, 1989].

0.3 mL de sangre periférica total fueron mezclados con 1.5 mL de amortiguador EL y mantenidos en hielo durante 15 min. El paquete celular fue separado mediante centrifugación a 400 Xg durante 10 min, a 4 °C. La pastilla celular fue lavada una vez

con 0.5 mL de amortiguador EL y resuspendida en 0.6 mL de amortiguador RLT. La lisis celular total se realizó mediante agitación con vórtex. El lisado fue transferido directamente dentro de la columna *QIAshredder*TM y centrifugado durante 2 min a máxima velocidad. El lisado homogenizado fue mezclado con 0.6 mL de etanol al 70%, transferido a una columna *QIAamp*TM y centrifugado durante 30 seg a 8,000 Xg.

El material atrapado en la membrana de la columna fue tratado con desoxirribonucleasa I (Roche) siguiendo las recomendaciones del proveedor. La columna fue lavada con 0.7 mL de amortiguador RW1 y con 0.5 mL de amortiguador RPE. El ARN fue aislado mediante la adición de 30 µL de agua libre de RNAsas y centrifugación durante 1 min a 8,000 Xg. La solución de ARN fue preservada a -20 °C hasta su uso.

III.4. Síntesis de la primera cadena de ADN complementario

La reacción de reverso-transcripción se realizó utilizando iniciadores (hexámeros) aleatorios y el estuche comercial *First Strand cDNA Synthesis Kit*TM (Novagen), siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante.

12 µL de RNA total fueron mezclados con 0.5 µL de hexámeros aleatorios [100 ng/µL]. La mezcla fue desnaturalizada durante 10 min a 70 °C, inmediatamente colocada en hielo y suplementada con 4 µL de amortiguador de RT [5X], 2 µL de DTT [100 mM], 1 µL de dNTPs [10 mM] y 0.5 µL de la enzima RT [1 U/µL]. La mezcla se incubó durante 10 min a temp. amb. y posteriormente durante 60 min a 37 °C. El producto obtenido fue utilizado directamente para amplificación por PCR o preservado a -20 °C.

III.5. Amplificación por PCR

Con el fin de lograr máxima especificidad, se utilizó un protocolo de PCR anidado (*nested*). Las mezclas de reacción se muestran en las Tablas 3 y 4. Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: un ciclo de 2 min a 94 °C (desnaturalización inicial); 35 ciclos de 0.5 min a 94 °C, 0.5 min a 55 °C, 1.0 min a 72 °C; y un ciclo de 7 min a 72 °C.

Se realizaron las reacciones de PCR de las 3 muestras de pacientes leucémicos *Ph*(+). Los productos de amplificación fueron separados en gel de agarosa al 2.5% y visualizados utilizando el agente intercalante bromuro de etidio.

Debido a que los falsos negativos son un problema inherente a la técnica de RT-PCR, se incluyó un control interno positivo en el cuál se amplifica un fragmento del factor de transcripción E2A (el cuál se transcribe de manera ubicua).

Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR inicial para la amplificación de un fragmento de la fusión *bcr-abl*.

m, menor; M, mayor.

Componente	m (µL)	M (µL)
Agua destilada estéril	13.25	13.25
Amortiguador para PCR [10X]	2.5	2.5
dNTPs [2.5 mM]	2	2
BCR1698U19.LC [10 µM]	1	-
BCR3060U23.LC [10 µM]	-	1
ABL661L20.LC [10 µM]	1	1
ADNc de <i>Ph</i> (+)	5	5
<i>Taq</i> ADN pol (Roche) [5 U/µL]	0.25	0.25

Tabla 4. Componentes de la reacción de PCR anidado para la amplificación de un fragmento de la fusión *bcr-abl*.

m, menor; M, mayor.

Componente	m (μL)	M (μL)
Agua destilada estéril	13.25	13.25
Amortiguador para PCR [10X]	2.5	2.5
dNTPs [2.5 mM]	2	2
BCR1777U19.LC [10 μM]	1	-
BCR3128U22.LC [10 μM]	-	1
ABL642L23.LC [10 μM]	1	1
Producto de PCR inicial	5	5
<i>Taq</i> ADN polimerasa (Roche) [5 U/μL]	0.25	0.25

Simultáneamente, se realizó un control interno para evaluar la posibilidad de amplificación a partir de restos de ADN.

III.6. Fosforilación y reparación de los productos de PCR

Previo a la ligación mediante extremos romos, los productos de PCR obtenidos fueron preparados siguiendo un protocolo de fosforilación y reparación del ADN, utilizando las enzimas de modificación polinucleótido cinasa (New England Biolabs) y el fragmento *Klenow* (Roche), respectivamente.

Se mezclaron 10 μL del producto de PCR, 2 μL de amortiguador con rATP [10X], 1 μL de dNTPs [2.5 mM], 0.5 μL de T4 polinucleótido cinasa [10 U/μL] y 0.5 μL de *Klenow* [2 U/μL] en un volumen final de 20 μL. La mezcla de reacción fue incubada

durante 30 minutos a 37 °C. Los productos de PCR fosforilados y reparados fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y visualizados con bromuro de etidio. El segmento del gel de agarosa que contiene el ADN de interés fue cortado y purificado utilizando el estuche comercial *QIAquick™ Gel Extraction Kit* (Qiagen).

III.7. Preparación del vector pBluescript SK- para clonar extremos romos

Para realizar la ligación mediante extremos romos, el plásmido comercial *pBluescript SK-* (Stratagene) fue digerido utilizando la endonucleasa de restricción *SmaI* (New England Biolabs) y defosforilado con la enzima fosfatasa alcalina (*bCIP*, New England Biolabs). Para reducir el fondo por autoligación, fue tratado adicionalmente con la enzima T4 ADN ligasa (Roche) y se recuperó el vector lineal (no autoligado).

1 µg de *pBluescript SK-* fue mezclado con 10 U de la endonucleasa *SmaI* en un volumen final de reacción de 10 µL. La digestión se realizó durante 1 hora a 25 °C. Se añadió 1 U de la enzima *bCIP*, se ajustó el volumen de reacción a 20 µL y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Las enzimas se inactivaron durante 15 minutos a 65 °C. Se agregaron 2 µL de amortiguador de ligación [10X] y 1 µL de la enzima T4 ADN ligasa. La autoligación fue permitida durante 2 horas a 16°C.

El plásmido lineal (no ligado) fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizado con bromuro de etidio. El segmento del gel que contiene el ADN de interés fue cortado y purificado utilizando el estuche comercial *QIAquick™ Gel Extraction Kit* (Qiagen).

III.8. Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa

Los fragmentos de ADN, productos de PCR o plásmidos linearizados, fueron purificados utilizando el estuche comercial *QIAquick™ Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor.

El fragmento de gel fue redisuelto en 3 volúmenes de amortiguador QG mediante incubación a 50-55 °C durante 10 min. Se añadió un volumen de isopropanol y se mezcló por pipeteo. La mezcla fue transferida a una columna *QIAquick™ Spin Column* y centrifugada a 13,000 rpm durante 1 min. El material retenido en la membrana de la columna fue lavado con 0.75 mL de amortiguador WB. El ADN fue separado mediante la adición de 30 µL de amortiguador EB y centrifugado a 13,000 rpm durante 1 min.

III.9. Ligación de fragmentos de ADN

pBluescript SK- (*Sma*I-defosforilado) y los fragmentos de la fusión *bcr-abl* fueron ligados utilizando la enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs). Adicionalmente, se realizó una reacción de autoligación del vector para verificar el fondo de la reacción. Se prepararon las siguientes mezclas de reacción (volumen en µL):

Componente	AutoL	L18	L42	L83	L87
Agua destilada estéril	5	-	-	-	-
Amortiguador de ligación [10X]	1	1	1	1	1
<i>pBluescript SK-</i> (<i>Sma</i> I-def) [2 ng/µL]	3	3	3	3	3
Producto de PCR 18	-	5	-	-	-
Producto de PCR 42	-	-	5	-	-
Producto de PCR 83	-	-	-	5	-
Producto de PCR 87	-	-	-	-	5
T4 ADN ligasa [1 U/µL]	1	1	1	1	1

Las reacciones se incubaron durante 16 horas a 16°C. Posteriormente, 1/2 del volumen de la mezcla fue utilizada para transformar células de *E. coli* competentes.

III.10. Transformación bacteriana y selección de transformantes estables

La transformación bacteriana se realizó mediante choque térmico, utilizando células de *E. coli* XL1-Blue MRF' competentes (preparadas siguiendo el protocolo estándar de laboratorio [Sambrook *et al.*, 1989]).

5 µL de cada mezcla de ligación fueron añadidos a alícuotas de células competentes (100 µL) y mantenidas en hielo durante 30 min. El choque térmico se realizó de la siguiente manera: la mezcla se colocó en un baño a 42 °C durante 5 min y posteriormente se regresó a hielo nuevamente. Después de transcurridos 5 min, las células fueron recuperadas mediante la adición de 1 mL de medio 2X YT e incubadas a 37 °C durante 30 minutos y 300 rpm.

1/5 y 1/10 del volumen de la suspensión celular fue inoculada sobre la superficie de medio LB sólido suplementado con ampicilina [150 µg/mL] y con una mezcla IPTG/X-gal [0.4 mM y 16 ng/µL, respectivamente].

Los medios inoculados fueron incubados durante la noche a 37 °C. Aquellas unidades formadoras de colonias capaces de crecer en presencia del antibiótico y que permanecieron blancas fueron consideradas como clonas estables.

III.11. Purificación rápida de plásmidos

De cada transformación, se seleccionaron aleatoriamente 6 colonias blancas y se procedió a purificar el plásmido por el método rápido (de lisis alcalina) para verificar la presencia del inserto.

3 mL de cultivo (LB líquido con ampicilina [150 µg/mL]) conteniendo colonias independientes fueron incubados durante la noche a 37 °C y 300 rpm. El paquete celular de 1.5 mL del cultivo bacteriano fue separado mediante centrifugación a 12,000 rpm durante 2 min y resuspendido en 200 µL de solución SET (sacarosa [50 mM], EDTA [10 mM], Tris-HCl [25 mM], pH 8). Las células fueron lisadas mediante la adición de 200 µL de solución de lisis (NaOH [0.2 M], SDS [1%]) y agitación vigorosa por inversión.

Inmediatamente, la solución fue neutralizada mediante la adición de 200 µL de solución de neutralización (acetato de potasio [3 M], pH 4.8). La mezcla se agitó vigorosamente, se colocó en hielo durante 10 min y fue centrifugada a 12,000 rpm durante 10 min. Los ácidos nucleicos fueron precipitados mediante la adición de 2 volúmenes de etanol absoluto frío y separados mediante centrifugación a máxima velocidad durante 10 minutos.

La pastilla de ácidos nucleicos fue lavada con 1 mL de etanol al 70% y secada al aire durante 10 – 15 minutos. Finalmente, la pastilla se disolvió en 100 µL de agua destilada estéril.

III.12. Análisis de restricción de los plásmidos recombinantes

Con el objeto de identificar la presencia del inserto (fragmentos de la fusión *bcr-abl*), los plásmidos recombinantes fueron sometidos a un análisis molecular con las endonucleasas de restricción *XbaI* y *XhoI* (New England Biolabs).

Se preparó una mezcla enzimática con el contenido siguiente: 7 μL de amortiguador NEB4 [10X], 1 μL de RNasa A [10 U/ μL] y 10 U de cada endonucleasa (*XbaI* y *XhoI*) en un volumen final de 35 μL . Posteriormente, se mezclaron 5 μL de la mezcla enzimática y 5 μL de cada plásmido purificado. La reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C. Los fragmentos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % y visualizados utilizando el agente intercalante bromuro de etidio.

III.13. Purificación de plásmidos a alta pureza

Una vez identificados los plásmidos que portan el inserto del tamaño esperado para cada fragmento amplificado, se prepararon cultivos frescos y se aisló el ADN plasmídico a alta pureza, utilizando el estuche comercial *QIAprep® Spin Miniprep* (Qiagen). Estas preparaciones fueron realizadas con el fin de obtener la secuencia nucleotídica.

El paquete celular de un volumen de 1.5 mL del cultivo bacteriano joven fue separado mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 1 min. La pastilla celular fue resuspendida en 250 μL del amortiguador P1 y mezclada con 250 μL del amortiguador P2. Inmediatamente, la mezcla se neutralizó con 350 μL del amortiguador N3. Las

proteínas precipitadas fueron separadas mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue transferido a una columna de *QIAPrep*TM. La columna fue lavada 500 µL de amortiguador PB y con 750 µL de amortiguador PE. Finalmente, el ADN plasmídico fue recuperado en 50 µL de amortiguador EB mediante centrifugación a 13,400 rpm durante 1 min.

III.14. Secuenciación de ADN

La secuencia nucleotídica de los fragmentos *bcr-abl* clonados fue obtenida mediante secuenciación automática de ADN. Este servicio fue prestado por la Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM (www.ibt.unam.mx).

III.15. Análisis bioinformático de secuencias de ADN

Las secuencias nucleotídicas y polipeptídicas deducidas fueron analizadas utilizando servidores en línea: *ORFfinder* del Centro Nacional de Información en Biotecnología de los E.U.A. (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) y *Translate* del Sistema Experto en Análisis de Proteínas de Suiza (ExPASy, www.expasy.ch). Adicionalmente, se utilizó el programa *Gene Construction Kit* v2.4. para Mac (Intelligenetics Inc.) para facilitar el manejo de datos. Las secuencias polipeptídicas deducidas fueron comparadas contra la base de datos del NCBI mediante un análisis comparativo tipo BLAST. La identificación de los puntos de la fusión génica *bcr-abl* se realizó de manera visual

apoyado con el programa *GenePalette* v1.2. para Windows (*Reagents of the University of California*) y comprobada mediante una comparación de secuencias tipo BLAST2. Los posibles puntos de recombinación se identificaron mediante una búsqueda de secuencias repetitivas tipo Alu en los intrones de los genes *bcr* y *abl* humanos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

IV.1. RT-PCR para amplificar fragmentos de la fusión bcr-abl

El análisis y la caracterización del punto de la fusión *bcr-abl* se realizó en tres voluntarios leucémicos con diagnóstico *Ph(+)*. Para fines del estudio, las muestras fueron registradas como 01, 02 y 03.

Mediante el uso de estuches comerciales, tanto el procedimiento de purificación del ARN total como el protocolo de síntesis de la primera cadena de ADN complementario fueron satisfactoriamente aplicados en el tratamiento de las muestras.

Un juego de oligonucleótidos reportados en la literatura [Pallisgard *et al.*, 1998], fue utilizado para amplificar un fragmento de las fusiones *bcr-abl* mayor o menor, mediante una estrategia de PCR “anidado”.

De acuerdo al análisis bioinformático, el segmento que se amplificará contendrá el punto de unión y la región flanqueante. Para comprobar lo anterior, inicialmente se realizó una búsqueda (tipo BLAST) en la bases de datos *GenBank*TM del Centro Nacional de Información en Biotecnología de los E.U.A. (www.ncbi.nlm.nih.gov) con el fin de identificar fusiones previamente caracterizadas.

Los resultados de la búsqueda (véase la Tabla 5) muestran que mediante esta metodología molecular es factible, e incluso, discernir el tipo de fusión *bcr-abl*.

Tabla 5. Algunos de los productos de la fusión *bcr-abl* reportados en la base de datos del NCBI *GenBank*TM.

Los números de acceso se encuentran al inicio de cada secuencia. Las regiones de hibridación con los oligonucleótidos utilizados en la amplificación inicial (*i*) se muestran en itálicas, en tanto que los utilizados en la amplificación anidada (*n*) se indican en negritas. Las longitudes corresponden a pb (pares de bases). En azul se encuentra la secuencia del gen *bcr* y en rojo el gen *abl*.

AF113911(<i>bcr-abl</i> menor) PCR <i>i</i> =414, <i>n</i> =320, fusion génica e1a2	
241	aagccccaccacctaaccgcatgttccgggacaaaagccgctctccctcgagaaactcgca
301	acagtccttcgacagcagcagtcacccccacgcccagtgccataagcggcaccggc actg
361	cccgggtgtcgtgtc cgaggccaccatcgtgggcgtccgcaagaccgggcagatctggcc
421	caacgatggcgaggcgcttccatggagacgcag aagcccttcagcggccagtagcatc
481	tgactttgagcctcagggctctgagtgaagccgctcgttggaactccaaggaaaaccttct
541	cgctggaccagtgaaaatgaccccaaccttttcgttgactgtatgatatttgtggccag
601	tggagataaacactctaagcataactaaaggtgaaaagctccgggtcttaggct ataatca
661	caatggggaatggtgtgaagcccaacccaaaatggccaaggtgggtcccaagcaacta
AJ131467(<i>bcr-abl</i> mayor); Productos de PCR <i>i</i> =480, <i>n</i> =397, fusion génica b2a2	
1	gcgaacaagggcagcaaggctacggagaggctgaagaagaagctgtcggagcaggagtc a
61	ctgctgctgcttatgtctcccagcatggccttcaggggtgcacagccgcaacggcaagagt
121	ta cacgttcctgatctcctctgact atgagcgtgcagagtgaggaggagaacatccgggag
181	cagcagaagaagtgtttcagaagcttctccctgacatccgtggagctgcagatgctgacc
241	aactcgtgtgtgaaaactccagactgtccacagcattccgctgacctcaataaggaag aa
301	gcccttcagcggccagtagcatctgactttgagcctcagggctctgagtgaagccgctcgt
361	tggaaactccaaggaaaaccttctcgttgaccagtgaaaatgaccccaaccttttcgtt
421	gcactgtatgatatttgtggccagtgagataaacactctaagcataactaaaggtgaaaag
481	ctccgggtcttaggct ataatcacaatggggaatggtgtgaagcccaacccaaaatggc
AJ131466 (<i>bcr-abl</i> mayor) Productos de PCR <i>i</i> =555, <i>n</i> =472, fusion génica b3a2	
1	gcgaacaagggcagcaaggctacggagaggctgaagaagaagctgtcggagcaggagtc a
61	ctgctgctgcttatgtctcccagcatggccttcaggggtgcacagccgcaacggcaagagt
121	ta cacgttcctgatctcctctgact atgagcgtgcagagtgaggaggagaacatccgggag
181	cagcagaagaagtgtttcagaagcttctccctgacatccgtggagctgcagatgctgacc
241	aactcgtgtgtgaaaactccagactgtccacagcattccgctgacctcaataaggaagat
301	gatgagtcctccggggctctatgggtttctgaatgtcatcgtccactcagccactggattt
361	aagcagagtt caa aagcccttcagcggccagtagcatctgactttgagcctcagggctctg
421	agtgaagccgctcgttggaactccaaggaaaaccttctcgttgaccagtgaaaatgac
481	cccaaccttttcgttgactgtatgatatttgtggccagtgagataaacactctaagcata
541	actaaaggtgaaaagctccgggtcttaggct ataatcacaatggggaatggtgtgaagcc
601	caaaccaaaatggccaaggtgggtcccaagcaactacatcacgccagtcaacagtcgt

Cabe mencionar que para cada amplificación, menor o mayor, se realizaron simultáneamente tres controles negativos: uno para descartar la posibilidad de amplificar productos a partir de ADN genómico, otros dos correspondientes a las reacciones de PCR

inicial y anidado, respectivamente (sin ADN). Por otro lado, para fines prácticos sólo se presentan los resultados donde se obtuvo producto de amplificación.

IV.2. Detección molecular de la fusión bcr-abl mayor

Utilizando el ADN complementario de las muestras 01, 02 y 03, fue posible amplificar un fragmento de la fusión mayor. La Figura 2 muestra los productos amplificados en la reacción de PCR anidado. De acuerdo a la nomenclatura, los productos de las reacciones de PCR 18, 42 y 87 (PPCR18, PPCR42 y PPCR87, respectivamente), señalados en el carril 2, presentan un fragmento de aprox. 400 pb, el cual, presumiblemente, puede corresponder a la amplificación de la fusión b2a2.

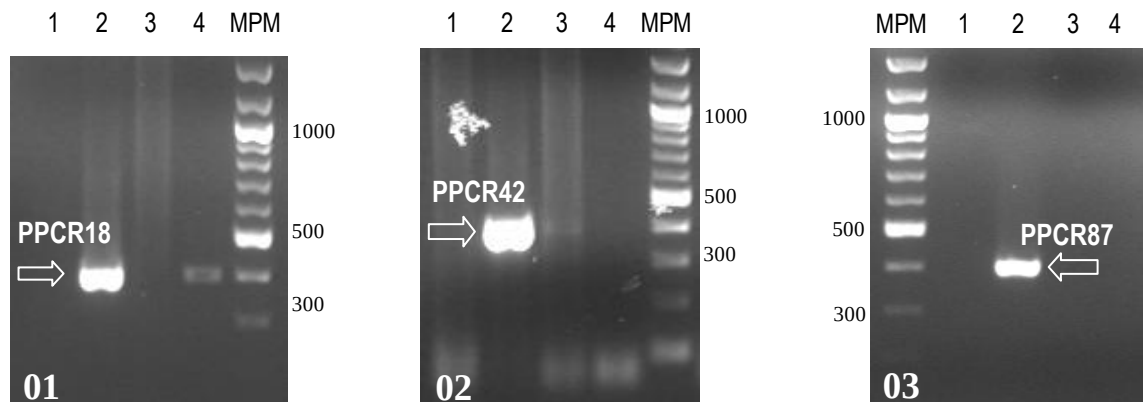


Figura 2. Separación de los productos de PCR anidado de la fusión *bcr-abl* mayor.

Geles correspondientes a las muestras 01, 02 y 03. En cada gel: 1, control negativo (ausencia de ADN); 2, producto de PCR de la fusión *bcr-abl* mayor; 3, control negativo (PCR inicial); 4, control negativo (PCR anidado); MPM, 2Log DNA Ladder 0.1–10 Kb (New England Biolabs), la talla se muestra en pb. Con una flecha se indica el producto amplificado. Gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio.

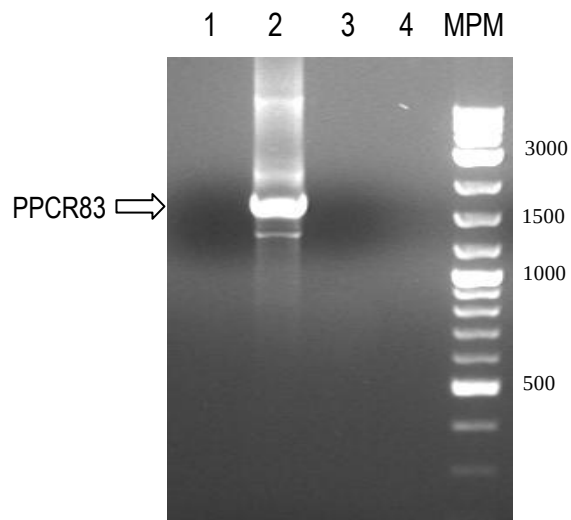


Figura 3. Separación de los productos de PCR anidado de la fusión *bcr-abl* menor de la muestra 03.

Gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1, control negativo (ausencia de ADNg); 2, producto de PCR de la fusión *bcr-abl* menor; 3, control negativo (PCR inicial); 4, control negativo (PCR anidado); MPM, 2Log DNA Ladder 0.1–10 Kb (New England Biolabs), el tamaño se da en pb.

Por otro lado, en algunos carriles correspondientes a controles negativos también presentan una amplificación leve. Esto, hace sospechar la existencia de contaminación cruzada en esos tubos; posteriormente, se analizaron otros controles negativos realizados de manera simultánea y no se observaron productos de amplificación (todos negativos), lo cual confirmó la sospecha.

IV.3. Detección molecular de la fusión *bcr-abl* menor

Adicionalmente, utilizando el ADN complementario de la muestra 03 se obtuvo un producto en la reacción de amplificación menor. La Figura 3 muestra un fragmento de aprox. 1500 pb (PPCR83) en el carril 2, el cual es un producto de tamaño inesperado.

Para fines de conocer que evento sucedió en esa reacción, PPCR83 fue clonado y secuenciado.

IV.4. Caracterización molecular del punto de fusión *bcr-abl*

Los productos de PCR obtenidos utilizando los oligonucleótidos para amplificar las fusiones *bcr-abl* (mayor y menor) fueron clonados en el plásmido *pBluescript* SK- para fines de secuenciación nucleotídica.

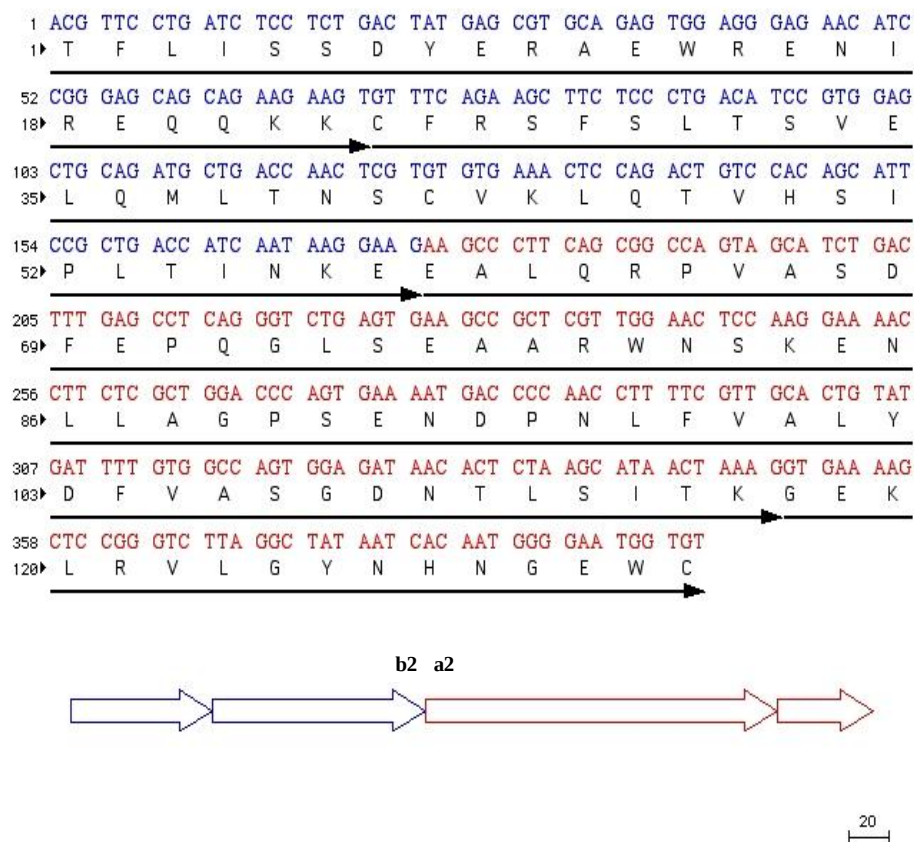


Figura 4. Secuencia nucleotídica y polipeptídica del producto de amplificación *bcr-abl* mayor obtenido a partir de la reacción de RT-PCR anidado de las muestras 01–03.

En el panel superior se muestran los segmentos correspondientes a los exones de *bcr* (azul) y *abl* (rojo). En el panel inferior se esquematiza la secuencia y se señalan los exones involucrados en el punto de fusión *bcr-abl*.

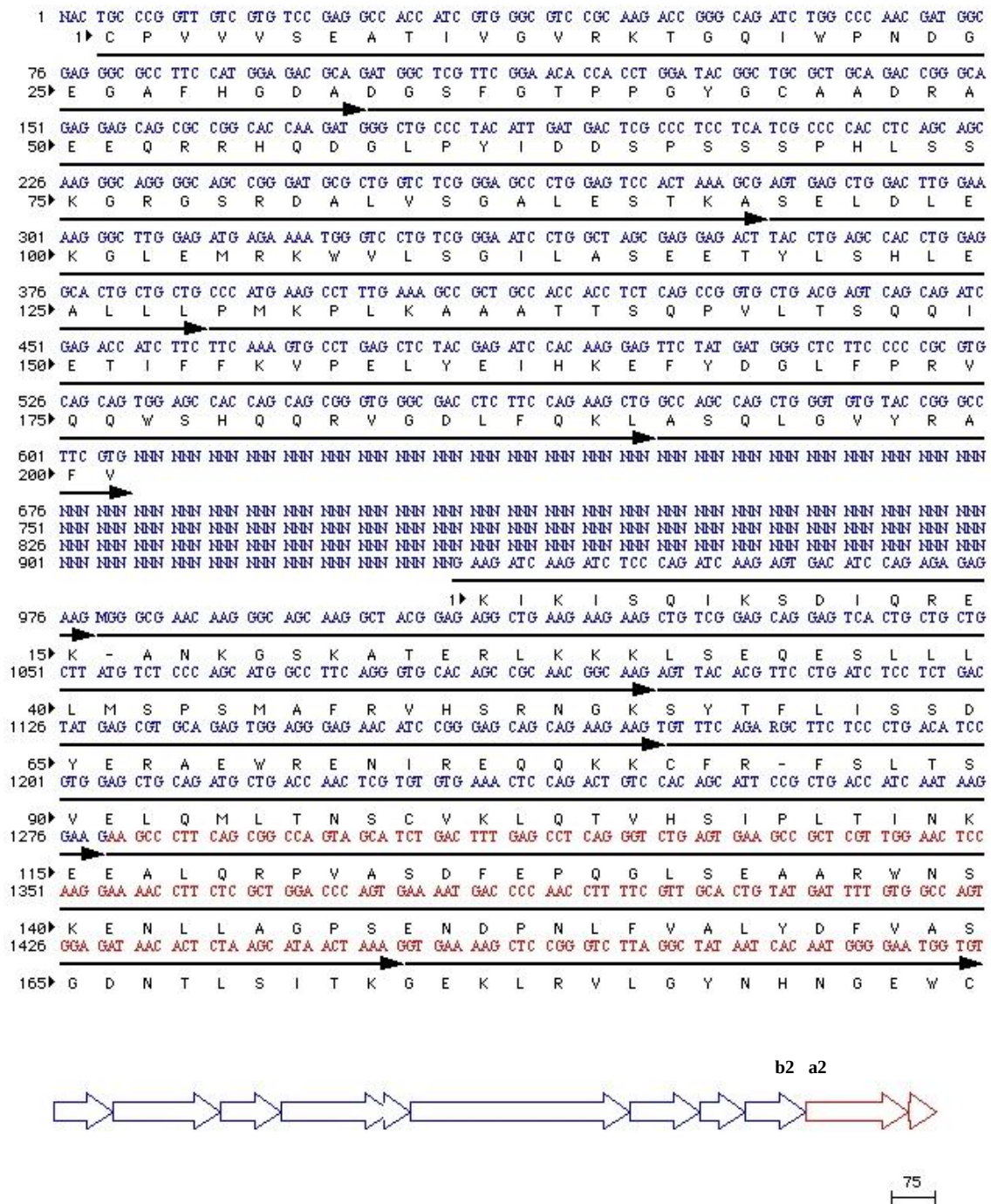


Figura 5. Secuencia nucleotídica y polipeptídica del producto de amplificación *bcr-abl* menor obtenido a partir de la reacción de RT-PCR anidado de la muestra 03.

En el panel superior se muestran los segmentos correspondientes a los exones de *bcr* (azul) y *abl* (rojo), en el panel inferior se esquematiza la secuencia y se señalan los exones involucrados en el punto de fusión *bcr-abl*.

La Figura 4 muestra la secuencia obtenida para los productos de PCR L18, L42 y L87. Se observó que la secuencia es idéntica para las tres muestras, la cual corresponde a la fusión del exón 14 de *bcr* con exón 2 de *abl* (fusión mayor b2a2).

En forma similar, la Figura 5 muestra la secuencia obtenida para el producto de PCR L83. Como se puede observar, se amplificó un fragmento mucho mayor al esperado en la región del gen *bcr* (desde el exón 1 hasta el exón 14); sin embargo, la fusión presentada por este fragmento *bcr-abl* corresponde a la previamente identificada, b2a2, en la amplificación mayor. De acuerdo al análisis bioinformático, es posible explicar que este fragmento fue amplificado a partir de oligonucleótidos de la reacción inicial y de la reacción anidada. Es decir, la reacción de PCR anidado con la muestra 03 para amplificar la fusión *bcr-abl* menor se contaminó con oligonucleótidos remanentes de la reacción de PCR inicial.

IV.5. Participación de las secuencias repetitivas Alu en la formación de t(9;22)

La translocación t(9;22) que da origen a las fusiones *bcr-abl* es producto de una recombinación no homóloga entre los cromosomas 9 y 22. Se ha observado que algunos intrones, localizados en ambos genes, son ricos en secuencias repetitivas tipo Alu; en los cuales se ha evidenciado la participación de estas secuencias en el proceso de recombinación [Jeffs, 1998].

En el caso del gen *abl*, se ha identificado un gran número de secuencias tipo Alu entre los exones 1 y 2, lo cual presuntamente explica la mayor frecuencia de translocación en este punto. Sin embargo, para el gen *bcr* la distribución de secuencias

tipo Alu es mucho mayor, abarcando intrones localizados entre los exones 1 y 17; especialmente y con mayor frecuencia entre los exones 1 y 2, y entre los exones 13 y 15.

V. CONCLUSIONES

Utilizando el estuche comercial *QIAamp*TM *RNA Blood Mini Kit* (Qiagen), fue posible obtener ARN total de células sanguíneas de individuos leucémicos *Ph*(+), el cual fue exitosamente amplificado mediante retro-transcripción utilizando hexámeros aleatorios y el estuche comercial *First Strand cDNA Synthesis Kit*TM (Novagen).

Los fragmentos de la fusión *bcr-abl* mayor fueron amplificados eficientemente mediante un esquema de reacción de PCR “anidado”, utilizando el juego de oligonucleótidos iniciadores reportados por Pellisgard y colabs (1998). Los fragmentos amplificados fueron clonados en el vector *pBluescript* SK- y, posteriormente, secuenciados. Mediante un análisis bioinformático, fue posible identificar a la fusión *bcr-abl* mayor, de tipo “b2a2”, en las tres muestras analizadas.

Finalmente, es evidente la importancia de la aplicación de técnicas de biología molecular (tal como la reacción de PCR) en la detección de translocaciones asociadas a leucemias y otras patologías en humanos; las cuales, cuando son correctamente implementadas y aplicadas, pueden ser muy útiles como herramientas de diagnóstico, pronóstico y seguimiento clínico de la enfermedad.

VI. BIBLIOGRAFIA

AMP, Academia Mexicana de Pediatría, Consenso Nacional en Hemato-Oncología Pediátrica; Disposición de Servicios. Consulta en línea (07/03/2003).

Besses Raebel C, Sans-Sabrafen J, Vives Corrons JL. Hematología Clínica. 4ta. Edición. Ediciones Harcourt SA. 2002.

CancerWEB - Childhood acute lymphoblastic leukemia, National Cancer Institute (<http://cancerweb.ncl.ac.uk/cancernet/100026.html>). Publicación electrónica (obtenida 03/02/2008).

Chisoe SL, Bodenteich A, Wang YF, Wang YP, Burian D, Clifton SW, Crabtree J, Freeman A, Iyer K, Jian L, *et al*. Sequence and analysis of the human ABL gene, the *BCR* gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics*. 1995; 27(1):67-82.

Elia L, Mancini M, Moleti G, Buffolino S, Krampera M, De Rossi G, Foá R, Climino G, A multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction strategy for the diagnostic molecular screening of chimeric genes: a clinical evaluation on 170 patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2003; 88(3):275-9.

Hjalgrim LL, Madsen HO, Melbye M, Jørgensen P, Christiansen M, Andersen MT, Pallisgaard N, Hokland P, Clausen N, Ryder LP, Schmiegelow K, Hjalgrim H. Presence of clone-specific markers at birth in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer*. 2002; 87(9):994-9.

- Jeffs AR, Benjes SM, Smith TL, Sowerby SJ, Morris CM. The BCR gene recombines preferentially with Alu elements in complex BCR-ABL translocations of chronic myeloid leukaemia. *Hum Mol Genet.* 1998; 7(5):767-76.
- Kurtzberg J. Principles and practice of pediatric oncology. Edited by Philip A Pizzo and David G Poplack. 3rd Edition. Lippincott-Raven Publishers, 1997.
- Marín C, Martínez-Delgado B, Meléndez B, Larrayoz MJ, Martínez-Ramírez A, Robledo M, Cigudosa JC, Calasanz MJ, Benítez J. Multiplex-polymerase chain reaction assay for the detection of prognostically significant translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2001;86(12):1254-60.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, Versión 1.0. IARC CancerBase No. 5. Lyon, IARCPress. 2001.
- Pallisgard N, Hokland P, Riishoj DC, Pedersen B, Jørgensen P. Multiplex reverse transcription – polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood.* 1998;92(2):574-88.
- Piedras Ross J, Barrales Benítez O, López Karpovitch X. Clasificación de las leucemias agudas de acuerdo con el consenso de la primera conferencia latinoamericana en la tipificación inmunológica de las leucemias. *Rev Invest Clin.* 2000;52(5):524-8.
- RHNM, Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Epidemiología México-Sector Salud 2000. Compendio del Registro histopatológico de neoplasias en México. DGE/SSA, JGH Editores, Instituto Nacional de Cancerología de México.

- Rivera Luna R. La importancia de los factores pronósticos en leucemia aguda linfoblástica (LAL) de la población pediátrica en un país en vías de desarrollo. Rev Inst Nal de Cancerol. 2000;46(4):260-6.
- Romero-Guzmán LT. ¿Se puede identificar un grupo de pacientes pediátricos de LAL de “bajo riesgo”? Gac Med Mex. 2002;138(1):S170-2.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Satake N, Sakamoto K. Acute lymphoblastic leukemia. E-Medicine (<http://www.emedicine.com/ped/topic2587.htm>). Publicación electrónica (obtenida 03/02/2008).
- Smith MA, Gloeckler LA, James G. Gurney, Julie A. Ross. Leukemia. SEER Pediatric Monograph. National Cancer Institute. 2002:17-34.
- SSA, Secretaría de Salud, Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño. Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2001. Salud Pública de México. 2002; 44(6):565-81.