



**CARACTERÍSTICAS CITO-MOLECULARES DE LA TRANSLOCACIÓN
t(9;22) Y ANÁLISIS DEL REORDENAMIENTO *BCR/ABL1* EN PACIENTES
CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.**

Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Farmacia y
Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires

Autor: Leandro Germán Gutiérrez.

Director: Dra. Irene Beatriz Larripa

Co-Director: Dr. Carlos Daniel De Brasi

Consejero Académico: Dr. Alberto Lazarowski

Lugar de trabajo: Laboratorio de Genética Hematológica, Instituto de Medicina
Experimental (IMEX), CONICET-Academia Nacional de Medicina.



A mi familia.

Agradecimientos

A mi familia, por su amor y su apoyo incondicional. Porque sin Uds no hubiera llegado hasta acá.

A la Dra. Irene Larripa y al Dr. Carlos De Brasi, por darme la posibilidad de formar parte del grupo de trabajo durante todos estos años. Por su valiosa guía y consejos tanto en el trabajo desarrollado como así también en lo personal, su paciencia, sus conocimientos y la confianza depositada en mí.

A las Dras. Verónica Ventriglia y Josefina Freitas por su constante aporte de muestras y datos tan necesarios.

A Sergio, al Tano, a Junior y Gera por acompañarme en casa!

A todos mis compañeros y amigos de laboratorio por hacerme sentir parte de una familia en todo momento, en especial con cada discusión en el almuerzo, de trascendental importancia para la vida.....y por supuesto...todo su apoyo y cariño de cada día.

A mis amigos..... Esos hermanos que me dio la vida! Los de acá, los de allá y los que todavía no conozco pero se hacen sentir!

A mis maestros y compañeros del DO, quienes me enseñan a superarme cada día!

A los siguientes organismos e instituciones que brindaron el lugar físico y los subsidios de investigación: Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET-Academia Nacional de Medicina, a la Fundación Roemmers, al Consejo Nacional de Investigaciones CONICET y a la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología ANPCyT.

Y a todos los que de una u otra forma.....GRACIAS!

Declaración de publicaciones.

Los resultados del presente trabajo de tesis han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos:

- "Frecuencia del cromosoma Philadelphia variante (Ph'), alteraciones cromosómicas clonales atípicas y su implicancia clínica en leucemia mieloide crónica (LMC)" **Gutiérrez LG**, Mercado-Guzmán V, Noriega M, Icardi G, Larripa I. Medicina, Buenos Aires, Vol 72, suplemento II. Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2012. ISSN 0025-7680.

--"Estudio citomolecular (FISH) y molecular (RT-PCR) del reordenamiento BCR/ABL1 y su recíproco ABL1/BCR en pacientes con LMC" **Gutiérrez LG**, De Brasi, Freitas J, Ventriglia V, Noriega MF, Belli C, Larripa I. Hematología, Vol 17, Mar del Plata, Argentina. Octubre 2013. ISSN 0329-0379/2250-8309.

-- "Case Report: Description of a Patient with Trisomy 22 in Inbred Line" **Gutiérrez LG**, Flavia Leveroni, Cristina Mayer, Jorge Doldán, Amada Rolón, Ana Melnichuk, Alejandro Laudicina, Sonia Bageston & Alberto Fenocchio, Journal of Life Sciences, Vol. 7, No. 12, pp. 1312-1316. USA. Diciembre 2013. ISSN 1934-7391.

--Clonal Evolution and Cytogenetic Changes in Chronic Myeloid Leukemia **Gutiérrez LG**, Belli C., Ferri C & Larripa IB. Capítulo 8 (181-200). In "Advances in Genetics, Vol 11". Editor: Kevin V. Urbano. Nova Science Publishers, Inc. (2014). ISBN: 978-1-62948-745-8 (e-book).

-- "- Evaluación de la respuesta citogenética/molecular y Deleción del derivado 9 en leucemia mieloide crónica" **Gutiérrez, Leandro**; Abelleiro, Martín; Ferri, Cristian; De Brasi, Carlos; Larripa, Irene. Medicina, Buenos Aires, Vol 74, suplemento III. Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2014. ISSN 0025-7680.

-- "Descripción de un Cromosoma Philadelphia variante en un paciente con leucemia mieloide crónica" **Gutiérrez, LG**; DOS SANTOS, Patricia C.; ROLÓN, Amada; MELNICHUK, Ana M.; ARGÜELLES, Carina F.; FENOCCHIO, Alberto S. Revista de Ciencia y Tecnología, RECyT. Secretaría de Investigación y Posgrado Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales Universidad Nacional de Misiones. ISSN: 0329-8922 (Print), 1851-7587 (Online). En prensa.

- An unusual translocation t(1;11)(q21;q23) in a case of chronic myeloid leukemia with a cryptic Philadelphia chromosome. **Gutiérrez LG**, Noriega MF, Laudicina A, Quattrin M, Bengió RM & Larripa I Oncology Letters. Spandidos Publications UK LTD. UK. Julio 2016. ISSN: 1792-1074. En prensa.



Resumen

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una enfermedad clonal de células madre hematopoyéticas (CMHs) de médula ósea (MO). La alteración citogenética característica es el cromosoma Philadelphia (Ph), producto de una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(q34;q11)]. La consecuencia molecular de esta translocación es el gen quimérico *BCR/ABL1* con actividad Tirosina Kinasa (TK) no regulada. Un 10–20% de los casos de LMC presentan deleciones adyacentes a los puntos de ruptura de la t(9;22) sobre el cromosoma der(9). Estas deleciones tienen un tamaño variable que frecuentemente afecta tanto secuencias del cromosoma 9 como del cromosoma 22 y su valor pronóstico en la era de los inhibidores de TK (ITKs) es controversial.

Con el objetivo de estudiar las deleciones submicroscópicas sobre 9q34 en pacientes con LMC (n=61) y desarrollar una herramienta molecular de caracterización del rearreglo *BCR/ABL1* genómico este trabajo incluye metodologías citogenéticas, cito-moleculares (FISH), de evaluación de niveles de expresión transcripcional y de análisis genómico de los rearreglos *BCR/ABL1* y el recíproco *ABL1/BCR* (PCR Inversa, PCR de larga distancia, PCR convencional y secuenciación de Sanger).

La frecuencia de deleciones sobre el der(9) encontrada en nuestro análisis alcanzó un 23% (14/61) del total de casos con LMC. Estos pacientes no presentaron diferencias significativas en sus características epidemiológicas y clínicas respecto a pacientes sin deleciones. Ocho de los 14 casos (57%) presentaron deleciones completas, afectando secuencias tanto de *ABL1* como de *BCR*. Tres pacientes (21%) tuvieron deleciones que sólo afectaron secuencias de *BCR* y otros tres (21%) presentaron coexistencia de dos clones neoplásicos con diferentes patrones de deleción, demostrando que al menos en algunos casos, las deleciones sobre el der(9) no son un evento simultáneo a la t(9;22).

Nuestro análisis, en concordancia con otros reportes, no mostró evidencia que sugiera que las deleciones sobre el der(9) promuevan inestabilidad cromosómica o que afecten los niveles de expresión de *BCR/ABL1*.

Para llevar adelante el análisis de haplo-insuficiencia, realizamos la evaluación de los niveles de expresión de tres genes supresores de tumor (GST) (*ASS1*, *PTGES* y *SMARCB1*) cercanos al punto de ruptura en el der(9). De los tres genes analizados, sólo la expresión relativa de *ASS1* fue afectada significativamente por la presencia de deleciones (n=14) respecto de los casos sin deleciones (n=47) (mediana de expresión relativa, 0,07 vs 0,45, p=0,0001). Este dato constituye evidencia a favor de la hipótesis

que sostiene que las deleciones sobre el der(9) afectan GSTs por el mecanismo de haploinsuficiencia.

Para evaluar si las deleciones tienen algún efecto pronóstico, comparamos los niveles de respuesta hematológica completa (RHC), citogenética mayor (RCgMa) y molecular ≥ 3 log (RM^{3.0}) alcanzados a los seis y 12 meses de iniciado el tratamiento con ITKs, en pacientes con y sin deleciones, no hallando diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, los valores de *odd ratio* (OR) mostraron cierta tendencia en los primeros seis meses de tratamiento (3,6 para RHC, de 2,6 para RCgMa, y de 4,5 RM >3 log) que disminuyó a los 12 meses (OR: RHC: 1,6; RCgMa: 1,5 y RM >3 log: 1,8), indicando que la presencia de deleciones en el der(9) podría constituir una señal de alerta (*warning*) a tener en cuenta en la respuesta a tratamiento con ITKs.

El tamaño acotado del *cluster* de ruptura de *BCR* (3,3 Kb) nos permitió el diseño, desarrollo y aplicación de un abordaje basado en PCR inversa para la caracterización del reordenamiento *BCR/ABL1* y su recíproco en seis pacientes con LMC al diagnóstico. Este abordaje permitió la elaboración de reacciones PCR directas de alta sensibilidad paciente-específica (PCR-PE) de gran utilidad para detectar la presencia de enfermedad mínima residual con potencial para la identificación de candidatos a iniciar protocolos de interrupción de tratamiento. La PCR-PE pudo detectar la presencia del clon neoplásico en todos los controles del tratamiento de los pacientes evaluados en paralelo por qRT-PCR mostrando una perfecta correlación entre ambas técnicas. Las características genómicas encontradas sobre los puntos de ruptura en *BCR* y en *ABL1* (elementos Alu, motivos recombinogénicos, cicatrices moleculares) nos permitieron sugerir al menos dos mecanismos moleculares diferentes implicados en el origen de la translocación t(9;22): NHEJ (*Non Homologous End Joining*) en 4 casos y FoSTeS (*Fork Stalling and Template Switching*) en los dos casos restantes.

El abordaje de caracterización del rearrreglo genómico *BCR/ABL1*, constituye una mejora significativa en la costo-efectividad y rapidez para la obtención de PCR-PE, cualidad que la convierten en una metodología ideal para el análisis de la translocación t(9;22) por PCR para su integración al sistema de salud aun en países con recursos limitados.

El conjunto de datos presentados en esta tesis indican que la LMC es una patología compleja, heterogénea desde su origen, y asociada a múltiples características que hacen de cada paciente un caso único cuya descripción completa

requiere de la combinación de abordajes citogenéticos, cito-moleculares y moleculares sobre muestras de ARN y ADN genómico.

Índice

Introducción	1
<i>Leucemia Mieloide Crónica</i>	2
<i>Características epidemiológicas y clínicas</i>	4
<i>Características citogenéticas</i>	5
<i>Translocaciones variantes</i>	6
<i>Deleciones</i>	8
<i>Características moleculares</i>	11
<i>Gen ABL1</i>	11
<i>Gen BCR</i>	11
<i>Gen quimérico BCR/ABL1</i>	12
<i>Gen quimérico ABL1/BCR</i>	14
<i>BCR/ABL1 a nivel genómico</i>	14
Objetivos	16
Materiales y Métodos	18
<i>Poblaciones y muestras</i>	19
<i>Cultivos y preparaciones cromosómicas</i>	19
<i>Extracción de ARN total</i>	19
<i>Extracción de ADN genómico</i>	20
<i>Métodos de análisis</i>	20

<i>Análisis citogenéticos</i>	20
<i>Bandeo G</i>	20
<i>Hibridación in situ con fluorescencia (FISH)</i>	20
<i>Análisis moleculares</i>	21
<i>Retrotranscripción (RT) del ARN</i>	21
<i>Análisis cualitativos de la expresión génica</i>	22
<i>PCR de Beta-Actina I</i>	22
<i>PCR nested (anidada) de BCR/ABL1</i>	23
<i>PCR nested de ABL1/BCR</i>	23
<i>Análisis cuantitativos de la expresión génica (PCR en tiempo real)</i>	25
<i>Q-RT- PCR BCR/ABL1</i>	25
<i>Q-RT- PCR de Genes Supresores de Tumor (GSTs): ASS1, SMARCB1 y PTGES</i>	25
<i>Análisis genómicos</i>	26
<i>I-LD-PCR (PCR Inversa de Larga Distancia, del inglés Inverse Long Distance PCR) de BCR/ABL1</i>	26
<i>Programas informáticos</i>	33
Resultados	34
<i>Características citogenéticas, cito-moleculares y expresión de BCR/ABL1 y ABL1/BCR en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica</i>	35
<i>Análisis citogenético</i>	35
<i>Análisis de FISH BCR/ABL1</i>	38

<i>Expresión transcripcional cualitativa de BCR/ABL 1 y ABL 1/BCR.....</i>	<i>43</i>
<i>Comparación de parámetros clínicos, moleculares, respuesta hematológica, citogenética y molecular entre pacientes con y sin deleciones sobre el der(9).....</i>	<i>43</i>
<i>Comparación de características clínicas y expresión transcripcional cualitativa de BCR/ABL 1 y ABL 1/BCR.....</i>	<i>44</i>
<i>qRT-PCR BCR/ABL 1 en pacientes con y sin deleciones al diagnóstico</i>	<i>45</i>
<i>Análisis de los niveles de expresión de GSTs (ASS1, PTGES y SMARCB1)</i>	<i>46</i>
<i>Gen ASS1 (Arginina Succinato Sintetasa).....</i>	<i>47</i>
<i>Gen PTGES (Prostaglandina E Sintetasa)</i>	<i>47</i>
<i>Gen SMARCB1 (Miembro 1 SWI/SNF Modificador de Cromatina Dependiente de Actina Asociado a Matriz de la Subfamilia B)</i>	<i>49</i>
<i>Comparación de la respuesta hematológica, citogenética y molecular entre pacientes con y sin deleciones.</i>	<i>50</i>
<i>Comparación de la respuesta hematológica.....</i>	<i>52</i>
<i>Comparación de la respuesta citogenética.....</i>	<i>53</i>
<i>Comparación de la respuesta Molecular</i>	<i>53</i>
<i>Análisis del reordenamiento BCR/ABL 1 a nivel genómico.....</i>	<i>54</i>
<i>Paciente #1</i>	<i>56</i>
<i>Paciente #2</i>	<i>57</i>
<i>Paciente #3.....</i>	<i>58</i>
<i>Paciente #4.....</i>	<i>59</i>
<i>Paciente #5.....</i>	<i>60</i>

<i>Paciente #6</i>	61
<i>Evaluación de enfermedad mínima residual. Análisis BCR/ABL1 genómico paciente específico vs. qRT-PCR transcripcional</i>	62
Discusión	65
<i>Aspectos epidemiológicos, citogenéticos y moleculares en LMC</i>	66
<i>Deleciones sobre el der(9)</i>	68
<i>El rearreglo genómico molecular BCR/ABL1 en LMC: Aplicación clínica</i>	75
<i>El rearreglo genómico molecular BCR/ABL1 en LMC: Caracterización del evento molecular y estimación del mecanismo</i>	77
Conclusiones	83
Referencias	88
Anexos	99
<i>Protocolo</i>	100
<i>Abreviaturas</i>	125

Introducción

Leucemia Mieloide Crónica

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una enfermedad clonal de células madre hematopoyéticas (CMHs) de médula ósea (MO), caracterizada principalmente por una sobreproducción neoplásica de granulocitos en sangre periférica (SP) e hiperplasia en MO. La capacidad de maduración de las células neoplásicas no está alterada y sus funciones normales se ven disminuidas [Olofsson, 1976; Faderl *et al.*, 1999].

En el año 1960, Nowell y Hungerford reportaron dos pacientes con leucemia mieloide crónica que presentaban un cromosoma del grupo G más pequeño, a esta alteración citogenética se la denominó cromosoma *Philadelphia* (Ph+) en honor a la ciudad donde fue descrita (figura 1) [Nowell & Hungerford, 1960].

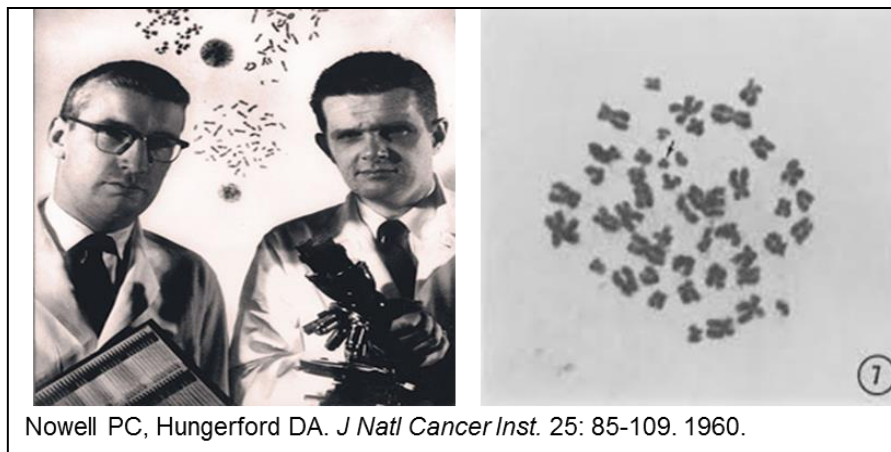


Figura 1.

En un primer momento, se pensó que este marcador se originaba a partir del cromosoma 21, pero en 1973, gracias al desarrollo de las técnicas de bandeado cromosómico, Janet Rowley demostró que el cromosoma *Philadelphia*, era un cromosoma derivado de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22; [t(9;22)(q34;q11)] (figura 2) [Rowley, 1973].

En la década del 80 y con el advenimiento de técnicas de biología molecular, fue posible demostrar que esta translocación genera un gen quimérico llamado *BCR/ABL1*. Este gen híbrido desempeña un papel primordial en la patogénesis de la LMC, dado que genera una oncoproteína con actividad de tirosina kinasa no regulada,

que activa las vías de señalización de Ras-MAPK, PI-3K y JAK-STAT en granulocitos [Kurzrock, *et al.*, 1988; Kurzrock, *et al.*, 2003].

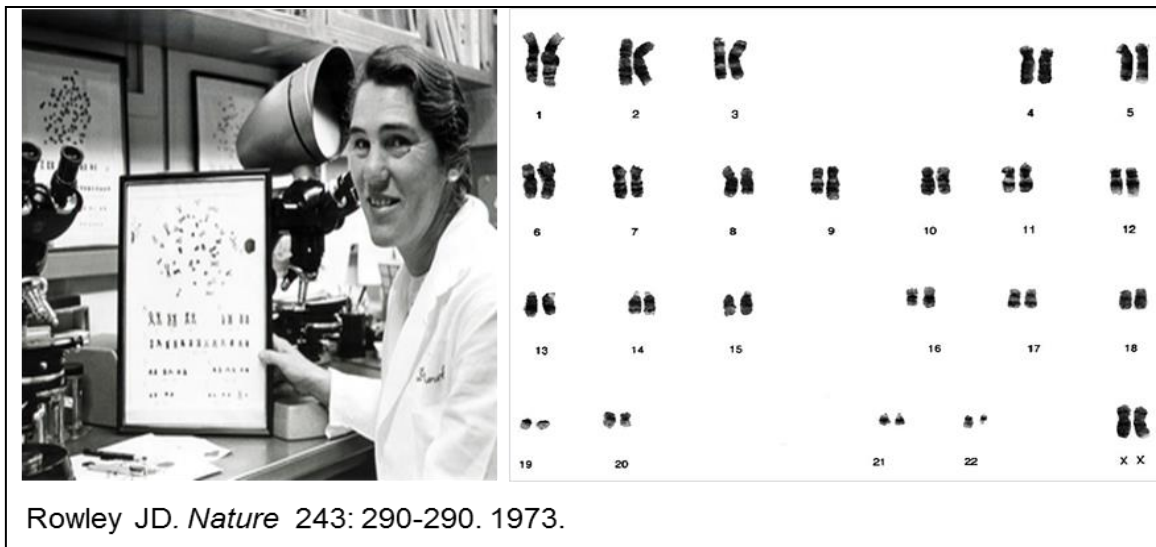


Figura 2.

La LMC fue la primer enfermedad neoplásica donde se demostró que un agente biológico (Interferón) podía suprimir en forma eficaz la proliferación del clon neoplásico, prolongando la vida del paciente [Talpaz, *et al.*, 1987]. A fines de los años 90, se identificó el STI-571 (Imatinib, Gleevec, Novartis®), una molécula diseñada racionalmente, es decir una droga creada del análisis de secuencias y predicción de la estructura 3D de la proteína quimérica BCR-ABL1, para ocupar específicamente el “bolsillo” catalítico del ATP y de esta forma, actuar como inhibidor específico de la actividad tirosina-kinasa (ITK) [Kurzrock *et al.*, 2003]. Las investigaciones demostraron que el STI-571 inhibía la proliferación de las células hematopoyéticas que presentaban el gen quimérico *BCR-ABL1*, limitando el crecimiento de los clones tumorales y reduciendo el riesgo de progresión a etapas más avanzadas y agresivas de la enfermedad [Druker, *et al.*, 2001].

En la actualidad, el avance tecnológico ha permitido el desarrollo de ITKs de segunda y tercera generación (Nilotinib, Dasatinib, Ponatinib, Bosutinib) (figura 3) que han permitido tratamientos más efectivos, alcanzando respuestas moleculares de mayor profundidad, mejorando ampliamente la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes. Estos ITKs de nueva generación basan su éxito en una inhibición más potente y específica de *BCR/ABL1*, cada uno con un perfil de toxicidad y actividad

diferente frente a las distintas mutaciones de resistencia que permiten una atención personalizada del paciente [Redaelli, *et al.* 2009; Frankfurt & Licht, 2013].

Características epidemiológicas y clínicas.

La LMC representa el 7-15% del total de leucemias en pacientes adultos y se estima que su incidencia es de 1-2 nuevos casos cada 100.000 personas por año.

Aunque es una patología que puede manifestarse a cualquier edad, es más común entre personas adultas mayores, con una edad promedio de 60 años al diagnóstico y un ligero predominio en pacientes masculinos en una relación 1,3/1 [Heim & Mitelman, 2009].

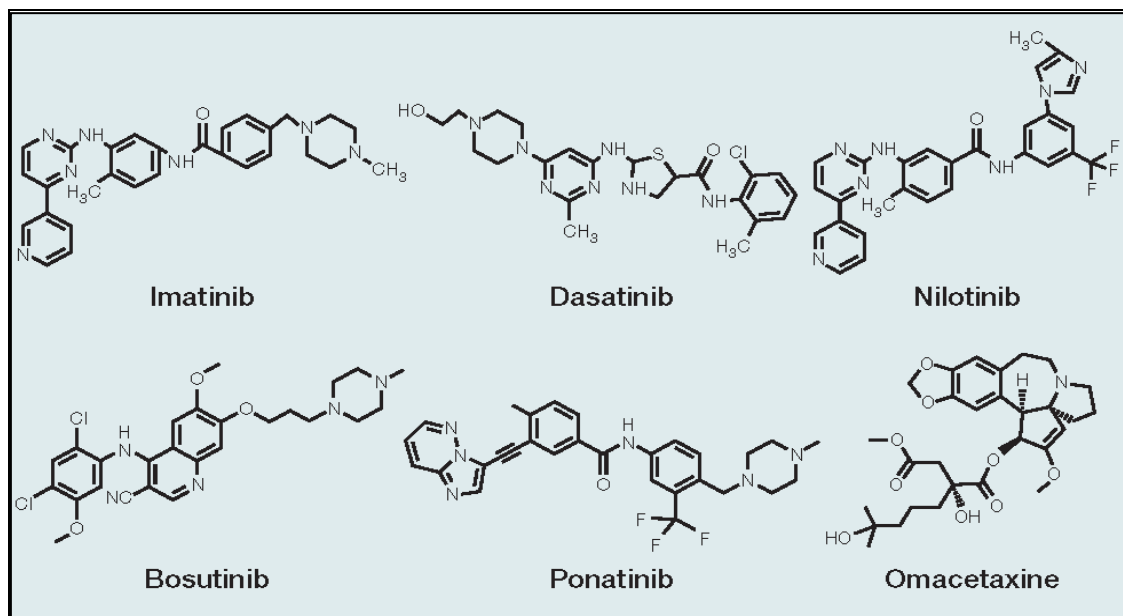


Figura 3. Estructura química del ITK de primera generación (Imatinib). ITKs de segunda generación (Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib). ITK de tercera generación (Ponatinib). Omacetaxine (Homoharringtonine, alcaloide natural)

El curso natural de la enfermedad involucra la evolución a través de tres fases bien definidas: una fase crónica, una fase acelerada y finalmente la crisis blástica.

En líneas generales, los pacientes son diagnosticados durante la fase crónica (LMC-FC). Esta fase está caracterizada por una clínica relativamente estable, que se presenta con fatiga, pérdida de peso, esplenomegalia, leucocitosis neutrofílica y la presencia en sangre periférica de 1-3% de blastos. La médula ósea (MO) de pacientes en esta etapa se distingue por una hiperplasia megacariocítica con megacariocitos típicamente pequeños con núcleos hipo-lobulados y cierta cantidad de mielofibrosis.

En contraste con las leucemias agudas, la diferenciación hematopoyética continua, sin aparente detención del proceso de maduración.

La fase acelerada (LMC-FA) está caracterizada por fiebre persistente, dolor óseo, sudoración nocturna, esplenomegalia progresiva, anemia, trombocitopenia ($<100.000/\text{mm}^3$), basofilia ($>20\%$) y los blastos alcanzan valores entre el 10-19%.

Finalmente, la crisis blástica (LMC-CB) se caracteriza principalmente por la presencia de blastos en valores $\geq 20\%$, hemorragias e infecciones recurrentes con un deterioro severo de la salud de los pacientes. En este punto, la enfermedad se comporta como una leucemia mieloide aguda.

Los criterios para establecer las diferentes fases de la enfermedad fueron propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y en numerosos trabajos previos (tabla 1) [Sokal *et al.*, 1988; Faderl *et al.*, 1999; Kantarjian *et al.*, 2002; Cortes *et al.*, 2006; Kantarjian *et al.*, 2006; Baccarani *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007; Heim & Mitelman, 2009; Beligoy *et al.*, 2015].

Tabla 1. Síntomas y características evaluados en la práctica clínica en LMC.

	Fase crónica	Fase acelerada	Crisis blástica
Clínica sistémica	Fatiga, pérdida de peso, esplenomegalia	Fiebre, dolor óseo, sudoración nocturna, esplenomegalia	Hemorragias e infecciones recurrentes
Sangre periférica	Leucocitosis neutrofílica, eosinofilia, basofilia y blastos (1-3%)	Anemia, trombocitopenia, basofilia y blastos (10-19%)	Blastos ($\geq 20\%$)
Médula ósea	Hiperplasia de granulocitos y megacariocitos	Blastos (10-19%)	Blastos ($\geq 20\%$)

Características citogenéticas

La alteración citogenética característica en LMC, es el cromosoma *Philadelphia* (Ph). El mismo es producto de una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(q34;q11)] (figura 4). El 85% de los pacientes son portadores de esta translocación clásica, los casos restantes presentan translocaciones variantes o cariotipos aparentemente normales, y en los cuales los genes *BCR* y *ABL1* están reordenados a través de inserciones crípticas o rearreglos más complejos, los que pueden ser identificados mediante técnicas de hibridación *in*

situ con fluorescencia (FISH) o con métodos de biología molecular [Yehuda *et al.*, 1999, Bennour *et al.*, 2011].

Translocaciones variantes

La LMC presenta en la mayoría de los casos un perfil citogenético sencillo caracterizado por la t(9,22) canónica, sin embargo, una proporción menor presenta mayor complejidad citogenética constituida mayormente por translocaciones variantes. El 10-15% de los casos de LMC presentan este tipo de alteraciones donde la formación del cromosoma Ph puede involucrar a uno o más cromosomas, además de los cromosomas 9 y 22 que participan de la translocación estándar.

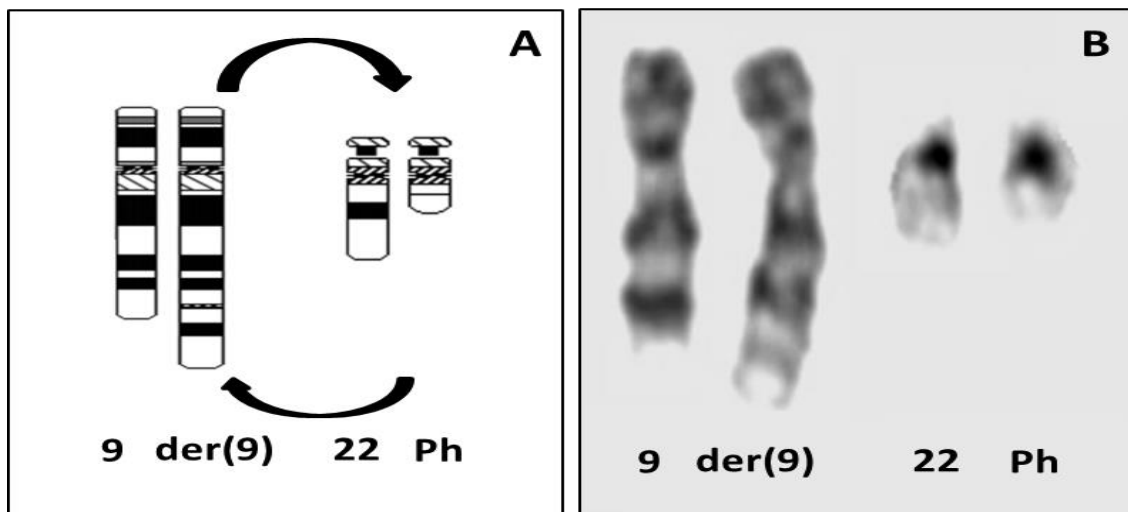


Figura 4. A: Ideograma de la t(9;22)(q34;q11) donde se aprecian los cromosomas 9, 22 y los cromosomas der(9) y der(22)(cromosoma *Philadelphia*). B: Foto-micrografía de t(9;22)(q34;q11) identificada mediante Bandeado G.

Las translocaciones variantes han sido clasificadas en dos subgrupos basados en los análisis citogenéticos: las variantes simples, donde el cromosoma 22 y otro cromosoma son los que dan origen al cromosoma Ph [t(22;V)], y las variantes complejas, donde además de los cromosomas 9 y 22, puede estar involucrado un tercer o incluso un cuarto cromosoma. En ambas variantes siempre se ha demostrado el reordenamiento *BCR/ABL1* indicando que el cromosoma 9 siempre está presente aunque citogenéticamente no se lo detecte [Reddy & Sulcova, 2000; Naumann. & Decker, 2003; Mkrtychyan *et al.*, 2008].

Todos los cromosomas han sido implicados como posibles participantes en translocaciones variantes. Sin embargo, la distribución de los puntos de ruptura

presentan un patrón no al azar, con una marcada acumulación sobre algunas bandas cromosómicas en particular: 1p36, 3p21, 3q21, 5q13, 6p21, 9q22, 11q23, 12p13, 19q13; sugiriendo que estas regiones son más proclives a sufrir rupturas [Johansson *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2005]. Incluso algunas de estas variantes tales como la $t(3;9;22)(p21;q34;q11)$ y $t(17;22)(q25;q11)$ han sido halladas mucho más frecuentemente que otras, con más de 10 casos reportados en la literatura [Fisher *et al.*, 2005].

Basados en los patrones de señal obtenidos con el método de FISH se han propuesto dos posibles mecanismos para explicar la formación de cromosomas Ph variantes: el mecanismo de una sola etapa; y el de dos etapas. El primero implica una ruptura simultánea en todos los cromosomas involucrados en la translocación compleja, y los segmentos implicados son reunidos en forma recíproca.

En el segundo, en primera instancia, se produce la formación de la translocación clásica, es decir una translocación entre los cromosomas 9 y 22. Ésta es seguida, por un segundo evento mutacional independiente que involucra un cromosoma adicional (figura 5) [Yehuda *et al.*, 1999; Reddy & Sulcova, 2000; Naumann. & Decker, 2003; Reid *et al.*, 2003; Gorusu *et al.*, 2007; Mkrtychyan *et al.*, 2008]. No existe un consenso acerca de la frecuencia de uno u otro mecanismo en los diferentes casos de LMC y los estudios acerca del valor pronóstico de cada una de estas variantes dan origen a resultados contradictorios, incluso bajo los regímenes actuales de tratamiento con ITKs [Nacheva *et al.*, 1994; Naumann & Decker, 2003; Reid *et al.*, 2003; El-Zimaity *et al.*, 2004; Weisberg *et al.*; 2005; Gorusu *et al.*, 2007; Heim & Mitelman, 2009; Bennour *et al.*, 2009; Belli *et al.*, 2011].

Sin embargo los datos más recientes sugieren que la presencia de translocaciones variantes no tienen impacto sobre la respuesta citogenética y molecular, independientemente del mecanismo o del número de cromosomas involucrados. El pronóstico de pacientes con *Philadelphia* variantes, tratados con ITKs como terapia de primera línea parece ser similar al de pacientes con la translocación clásica [Richerbourg *et al.*, 2008; Marzocchi *et al.*, 2011].

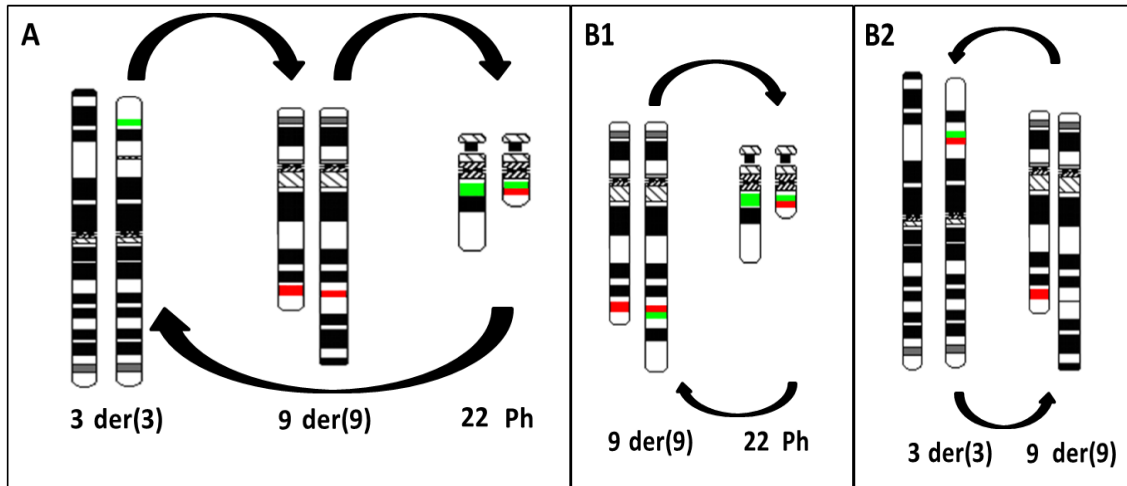


Figura 5. Representación esquemática de los diferentes mecanismos implicados en translocaciones variantes. Se indican las sondas empleadas en la metodología de FISH de doble color/doble fusión usada para poner en evidencia los distintos mecanismos. En rojo (R) se muestra la sonda que marca la región del gen *ABL1* sobre el cromosoma 9, en verde (V), la sonda que marca el gen *BCR* sobre el cromosoma 22 y la marca R/V o V/R (fusión, F) que corresponde a los genes quiméricos *BCR/ABL1* y su recíproco *ABL1/BCR* que son formados de la mezcla de colores rojo y verde al producirse la translocación. **A:** Mecanismo de una sola etapa, donde las rupturas en todos los cromosomas involucrados es simultánea, en el ejemplo, la porción de la región 9q34 es translocada al cromosoma 22 formando el cromosoma Ph, a su vez la región 22q11 del Ph, en lugar de ser translocada a cromosoma der(9), es translocada a un cromosoma diferente, en el ejemplo uno de los cromosomas 3. Cuando analizamos el patrón de señales de FISH, sólo puede observarse una señal F sobre el cromosoma Ph y la señal correspondiente a la segunda fusión no puede formarse. El patrón señales de FISH con sondas doble color/doble fusión para mecanismos de una sola etapa es: 2R, 2V, 1F. **B1:** Mecanismo de 2 etapas, en esta representación se observa que en primera instancia se produce la translocación clásica, donde la región 9q34 es translocada a la región 22(q11) y parte de la región 22q11 es llevada en forma recíproca a la región 9q34 formando así el cromosoma Ph (der(22)) y el cromosoma der(9). El patrón de FISH en este caso es: 1R, que corresponde al cromosoma 9 no translocado, 1V correspondiente al cromosoma 22 no translocado y 2F correspondientes al cromosoma Ph y al der(9). **B2:** En una segunda translocación, la señal de fusión sobre el der(9) formado en la primera etapa es translocado a un tercer cromosoma, en el ejemplo al cromosoma 3p21. El patrón de señales de FISH no difiere de la primera etapa (1R, 1V, 2F), sin embargo una de las señales de fusión ha sido ubicada en otro cromosoma.

Deleciones

Un 10–20% de los casos de LMC presentan deleciones adyacentes a los puntos de ruptura de la t(9;22) sobre el cromosoma der(9) [Huntly *et al.*, 2003]. Si bien a nivel citogenético la t(9;22), parece balanceada, el análisis por FISH ha demostrado que estas deleciones tienen un tamaño variable que frecuentemente afecta tanto secuencias del cromosoma 9 como del cromosoma 22 sobre el der(9), lo que significa que las secuencias de la fusión recíproca *ABL1/BCR* y secuencias adyacentes podrían estar perdidas [Sinclair *et al.*, 2000; Huntly *et al.*; 2002].

Estas deleciones de material genético parecen tener lugar al momento de producirse la translocación, por consiguiente, no ocurrirían como un evento posterior durante la evolución de la enfermedad e identificarían un subgrupo de pacientes con peor pronóstico y menor supervivencia [Sinclair *et al.*, 2000; Kolomietz *et al.*, 2001; Huntly *et al.*, 2001; 2003; Heim & Mitelman, 2009; Bennour *et al.*, 2009; Bennour *et al.*, 2012].

Los pacientes portadores de deleciones pueden ser clasificados en 3 grupos: deleciones que abarcan ambas secuencias, es decir secuencias del cromosoma 9 como del cromosoma 22; deleciones que afectan secuencias “río arriba” del punto de ruptura, es decir, sólo del cromosoma 9; y deleciones “río abajo” que solo afectan secuencias del cromosoma 22 en el der(9) (figura 6) [Heim & Mitelman, 2009; Bennour *et al.*, 2012].

El posible rol de las deleciones sobre el der(9) respecto de su valor pronóstico es controversial, muchos estudios han encontrado una relación directa entre la presencia de la deleción y características pronósticas adversas [Huntly *et al.*, 2003; Gorusu *et al.*, 2007; Vaz de Campos *et al.*, 2007; Baccarani *et al.*, 2009; Siu *et al.*, 2009; Heim & Mitelman, 2009, Bennour *et al.*, 2012]. Estudios comparativos de pacientes tratados con Imatinib parecerían no mostrar diferencias en la respuesta citogenética, supervivencia total o duración de la respuesta, sugiriendo que el valor pronóstico de las deleciones queda reducido cuando el tratamiento es con ITKs. [Quintas-Cardama *et al.*, 2006; Castagnetti *et al.*, 2010].

Si bien se desconoce el mecanismo por el cual las deleciones ejercen su efecto adverso, se postuló que éstas podrían afectar genes supresores de tumor (GST), mediante un mecanismo de haplo-insuficiencia [Specchia *et al.*, 2004; Douet-Guilbert *et al.*, 2006]. Aunque la pérdida completa de función de un GST es un estado recesivo, donde ambos alelos deben estar inactivados para generar una ventaja selectiva para el clon neoplásico (modelo de dos *hits* de Knudson) [Knudson, 1985], existe evidencia en varios cánceres humanos que la pérdida de un solo alelo de un GST puede conferir una ventaja selectiva al clon neoplásico, permitiendo la adquisición de mutaciones subsecuentes durante la progresión de la enfermedad, sin que el alelo normal se vea afectado en un principio [Cook & McCaw, 2000; Quom & Berns, 2001].

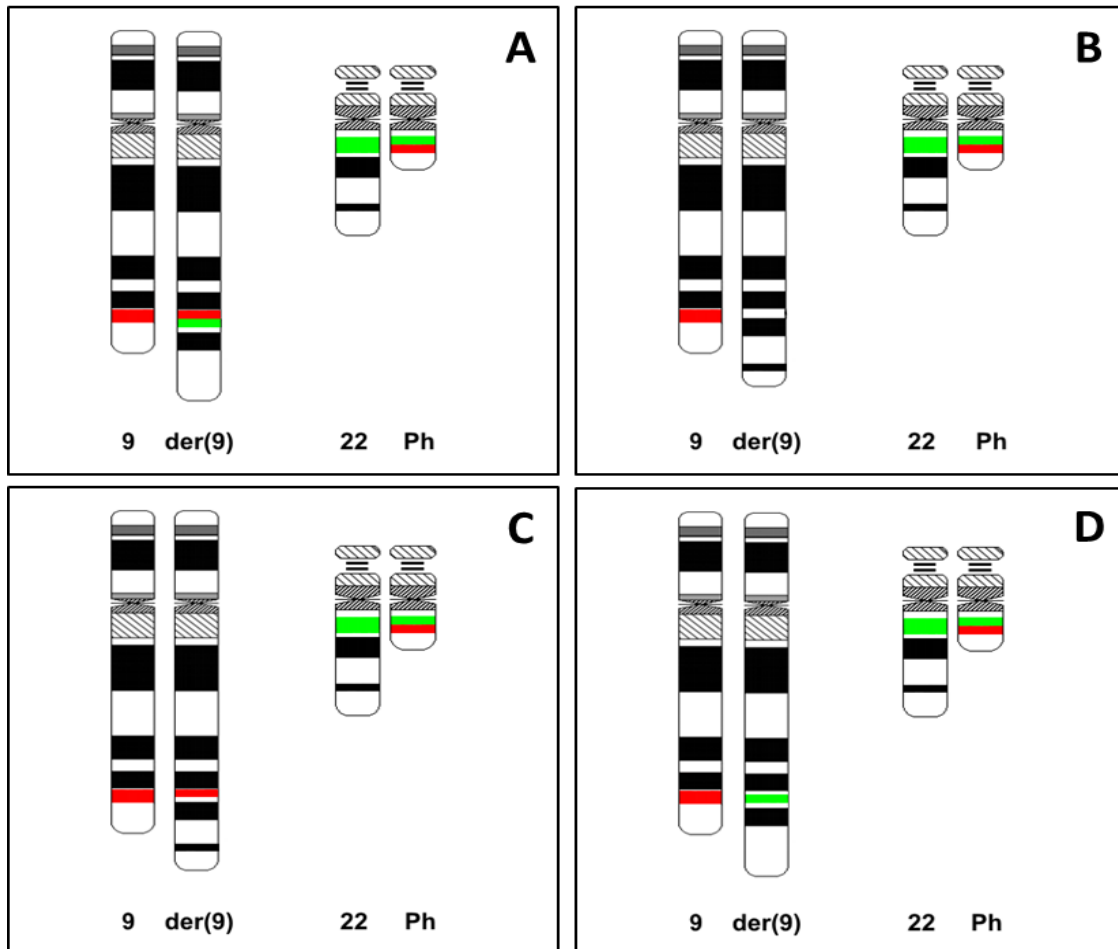


Figura 6. La metodología de FISH usando sondas para BCR/ABL1 con un sistema de doble color/doble fusión, constituyen una herramienta indispensable para poner en evidencia deleciones sobre el der(9). **A:** Ideogramas esquemáticos de los cromosomas 9, der(9), 22 y Ph, que muestran el patrón esperado para una translocación clásica sin deleciones (1R, 1V, 2F: 1 señal R del cromosoma 9 no translocado, 1 señal V del cromosoma 22 no translocado, 2 señales F, una del Ph y la restante marcando el der(9)). **B:** Ejemplo de deleción sobre el der(9), que afectó tanto secuencias del gen *ABL1* y del gen *BCR*, lo que se pone en evidencia por la ausencia de la señal F sobre el der(9). **C:** Ejemplo de deleción sobre el der(9), que solo afectó secuencias del gen *BCR*, lo que se pone en evidencia por la ausencia de la señal V y la presencia residual de 1 señal R sobre el der(9). **D:** Ejemplo de deleción sobre el der(9) que solo afectó secuencias del gen *ABL1*, lo que se pone en evidencia por la ausencia de la señal R y la presencia residual de 1 señal V sobre el der(9).

Se ha encontrado que varios GSTs tales como *PRDM12*, *ASS*, *PTGES* en 9q34 y *SMARCB1*, *GSTT1*, *GSTT2* en 22q11 ocupan *loci* en las regiones delecionadas sobre el der(9) [Huntly *et al.*, 2003]. Specchia *et al* investigando la pérdida de GSTs y utilizando un apropiado grupo de sondas BAC/PAC (siglas en inglés de los sistemas de clonado *bacterial artificial chromosome/phage artificial chromosome*) para FISH, informaron que el gen *PTGES* se perdía en el 73% de los casos que presentaban deleciones sobre el der(9), mientras que los genes *SMARCB1* y *GSTT1* del cromosoma 22 ubicados sobre el der(9), se encontraban delecionados en

el 90% de los casos indicando posibles candidatos para conferir la ventaja proliferativa del clon neoplásico, aunque aún el estudio de estos genes son motivo de investigación [Specchia *et al.*, 2004].

Características moleculares

Gen *ABL1*

El gen *ABL1* (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*, GRCh38.p7; NC_000009.12: 130713881..130887675) es un proto-oncogen de 173 Kb (173795bp) de ADN genómico homólogo al oncogen viral del virus de la leucemia murina de Abelson (v-abl) [Abelson & Rabstein, 1970]. Está situado en el brazo largo del cromosoma 9 (9q34.1), abarca 12 exones y muestra expresión tisular ubicua. Codifica para una proteína de 145 KDa con actividad tirosina kinasa no receptora que ha sido involucrada en una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo división, adhesión, diferenciación y respuesta a estrés celular [Rosenberg & Witte, 1998; NCBI/Gene, 2016]. Esta proteína presenta dos isoformas, ABL1a y ABL1b, que son generadas por *splicing* alternativo del primer exón (1a y 1b). Su actividad proteica está regulada negativamente por su dominio SH3, y la supresión del mismo la convierten en un oncogen.

La proteína ABL1 presenta un rol complejo como modulador celular, integrando múltiples señales extra e intra celulares que influyen en la continuidad del ciclo celular o el inicio de apoptosis [Van Etten, 1999; Deininger *et al.*, 2000, Kurzrock *et al.*, 2003].

Gen *BCR*

El gen *BCR* (*Break point cluster region*, GRCh38.p7, NC_000022.11: 23180365..23318037) abarca 137kb (137673) de ADN genómico está situado en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11.23). Es un gen de 23 exones que presenta expresión tisular ubicua y codifica para una proteína de 160 KDa [Stam *et al.*, 1987; NCBI/Gene, 2016]. La proteína codificada por *BCR* es una proteína compleja con actividad serina/treonina kinasa y actividad GTPasa para la proteína p21rac. [Montaner *et al.*, 1998; Kurzrock *et al.*, 2003]. Como en el caso de *ABL1* el nivel de expresión transcripcional de *BCR* disminuye a medida que progresa la maduración de las células hematopoyéticas mieloides [Wetzler *et al.*, 1993].

Gen quimérico *BCR/ABL1*

Como se mencionó anteriormente, en la LMC el gen quimérico *BCR/ABL1* es el resultado directo de la translocación t(9;22)(q34;q11). El producto de traducción de este gen quimérico tiene actividad tirosina kinasa no regulada y ejerce su actividad transformante por la activación de Ras, una proteína clave en vías de señalización celular en diversos tipos celulares [Kurzrock, *et al.*, 1987; Tauchi, *et al.*, 1998].

El punto de ruptura del gen *ABL1* está distribuido sobre un gran área (>150 kb) y comprende los dos primeros intrones 1b y 1a (figura 7). De esta forma, los exones 2 al 11 (también llamados a2–a11) de *ABL1* son translocados y fusionados a la región 5' del gen *BCR* [Jiang *et al.*, 1990; Ross *et al.*, 2010]. Independientemente del intrón afectado por la translocación, los exones 1b y 1a son removidos durante el *splicing* del mensajero quimérico, por lo que el exón 2 de *ABL1* es el que aparece yuxtapuesto a los exones de *BCR* en LMC [Rowley, 1998; Heim & Mitelman, 2009].

Respecto a *BCR*, tres regiones asociadas a sitios de ruptura han sido identificadas: la primera entre los exones e1 y e2, conocida como el *cluster* de ruptura menor (m-BCR, del inglés, *minor breakpoint cluster region*); el segundo sitio entre los exones e13-e15 (también llamados b2-b4) llamado clúster de ruptura mayor (M-BCR, del inglés, *major breakpoint cluster región*) y un sitio entre los exones e19-e20, el clúster de ruptura micro (μ -BCR, del inglés, *micro breakpoint cluster región*) (figura 7) [Heim & Mitelman, 2009].

La mayor parte de las rupturas reportadas en LMC (>95%) ocurren en M-BCR, en una región de aproximadamente 3,3 kb, que abarca a los intrones 13 y 14 [Melo, 1996, Deininger *et al.*, 2000].

Estos diferentes puntos de ruptura pueden producir dos diferentes tipos de transcritos dependiendo de si la ruptura está localizada entre los exones 13-14 (b2-b3) o 14-15 (b3-b4) del *BCR*. Si la translocación t(9;22) ocurre entre los exones 13-14 de *BCR*, la transcripción del gen quimérico *BCR/ABL1* expresará la isoforma conocida como b2-a2, en cambio, si la ruptura ocurre entre los exones 14-15, *BCR/ABL1* expresará la isoforma llamada a b3-a2. Eventos de *splicing* alternativo permitirán la expresión de ambos productos de fusión en el 5% de los casos de LMC [Melo, 1996].

Las características clínicas, respuesta al tratamiento y pronóstico son similares en los pacientes que portan el transcrito b2a2 o el b3a2 [Shepherd *et al*, 1995].

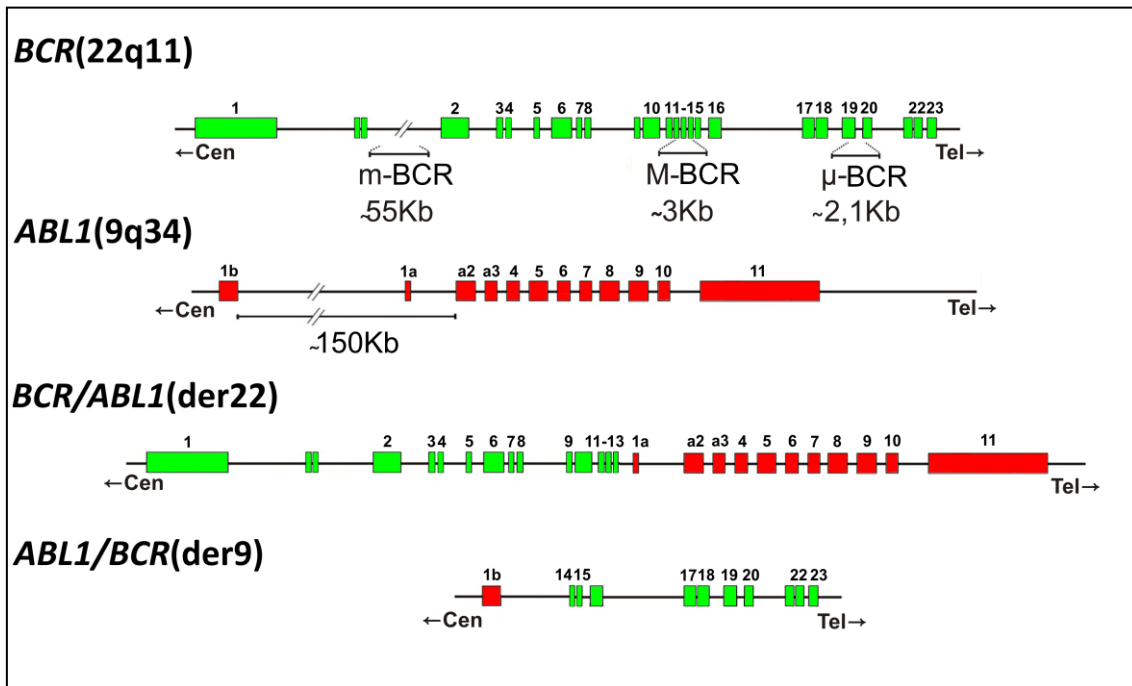


Figura 7. Estructura genómica de los genes *BCR*, *ABL1*, *BCR/ABL1* y el recíproco *ABL1/BCR*. Las cajas verdes representan los exones de *BCR*, las cajas rojas los exones de *ABL1*. Se indican las regiones asociadas a los tres diferentes *clusters* de puntos de ruptura encontrados sobre *BCR* (m-BCR, M-BCR y μ-BCR) y la región de las rupturas sobre *ABL1*, que abarca unas 150 kb y comprende a los dos primeros intrones.

Por otro lado, en el 80% de las Leucemias Linfoblásticas Agudas (LLA) Ph positivas, la ruptura sobre *BCR* ocurre en el m-BCR, una región de aproximadamente 55 kb. El tercer *cluster* de puntos de ruptura en *BCR* es el llamado μ-BCR y ha sido descrito asociado principalmente a casos de Leucemias Neutrofílicas Crónicas Ph positivas, está localizado “río abajo” de M-BCR y abarca una región genómica de aproximadamente 2,1 kb [Kurzrock *et al*, 1987; Anderson *et al*, 2005].

Estos tres diferentes tipos de transcritos *BCR/ABL1* producen tres isoformas de la proteína oncogénica con diferente nivel de actividad de TK. La proteína de fusión clásica de 210 KDa (p210^{Bcr/Ab1}) está asociada a rupturas en M-BCR y es la más frecuentemente encontrada en LMC. La proteína quimérica BCR/ABL1 de 190 KDa (p190^{Bcr/Ab1}) resulta de rupturas en el m-BCR, mientras que la proteína de 230 KDa (p230^{Bcr/Ab1}) se asocia a rupturas en μ-BCR [Kurzrock *et al*, 1988; Melo *et al*, 1994; Heim & Mitelman, 2009].

La actividad TK es central en la señalización y crecimiento celular, por ello, una actividad tirosina kinasa elevada constitutivamente activa ha sido extensamente asociada a transformación tumoral. El grado de actividad transformante de *BCR/ABL1* se correlaciona con el grado de actividad TK. La proteína p190^{Bcr-Abl1}, con la mayor actividad TK, está asociada al desarrollo de un fenotipo de leucemia aguda, más agresiva, mientras que las isoformas p210^{Bcr-Abl1} y p230^{Bcr/Abl1} tienen su rol en fenotipos de leucemias crónicas de progresión más lenta [Kurzrock *et al.*, 2003].

Gen quimérico *ABL1/BCR*

Así como el gen quimérico *BCR/ABL1* es el resultado directo de la translocación t(9;22)(q34;q11), también lo es el gen quimérico recíproco *ABL1/BCR* sobre el der(9). En contraste con la gran cantidad de información sobre *BCR/ABL1*, poca atención se ha puesto sobre *ABL1/BCR*. Se sabe que el 60% de los pacientes con LMC expresan ARNm de *ABL1/BCR* [Melo *et al.*, 1993].

A principios del 2000, se sugirió que una proteína quimérica codificada por este gen recíproco podría tener un rol regulador negativo sobre la actividad kinasa de *BCR/ABL1* (p210), sin embargo, hasta el día de hoy, nunca se ha aislado un producto proteico de *ABL1/BCR*, así como tampoco se conoce actividad biológica directa del mensajero *ABL1/BCR* [Huntly *et al.*, 2003, Heim & Mitelman, 2009].

Si bien la ausencia de expresión de *ABL1/BCR* no ha podido ser relacionada directamente con la presencia de grandes deleciones sobre el der(9), la expresión *ABL1/BCR* se ha empleado como marcador de ausencia de deleción del gen quimérico recíproco [De la Fuente *et al.*, 2001; Huntly *et al.*, 2002; 2003].

***BCR/ABL1* a nivel genómico**

En LMC el *cluster* de ruptura de *BCR* está acotado a una región particular de 3,3kb, el M-BCR, mientras que en *ABL1* el *cluster* es de gran tamaño con una longitud de poco más de 150 kb [Jiang *et al.*, 1990; Melo, 1996; Deininger *et al.*, 2000]. Dos consecuencias se derivan de esta situación: Primero, la secuencia de fusión *BCR/ABL1* genómica para cada paciente es específica y virtualmente única a diferencia de los ARNm de fusión; y segundo realizar un análisis de las secuencias

genómicas involucradas en la translocación sobre ADN resulta un desafío metodológico muy complejo dado el tamaño del *cluster* de *ABL1*.

En general todos los pacientes con LMC expresan alguna de las dos versiones más comunes de *BCR/ABL1* (e13-a2 o e14-a2) permitiendo el monitoreo molecular a través de RT-PCR cualitativa y cuantitativa [Hughes *et al.*, 2003; Kantajian *et al.*, 2006; Branford & Hughes, 2006; Branford *et al.*, 2006].

El seguimiento de los niveles de transcripto *BCR-ABL1* es fundamental para evaluar la respuesta al tratamiento. Entre el 40-50% de los pacientes logran una respuesta molecular profunda (> 4 log de reducción) indicando que el clon neoplásico fue erradicado, o que se encuentra en un estado residual no proliferante [Kantarjian *et al.*, 2006; Branford *et al.*, 2006]. La discriminación entre estas dos situaciones implica el estudio del reordenamiento *BCR/ABL1* a nivel genómico [Ross *et al.*, 2010; Score *et al.*, 2010].

Los sistemas actuales de análisis de *BCR/ABL1* genómico están basados en múltiples amplificaciones lineales del rearreglo con metodología de PCR de larga distancia (PCR-LD) usando múltiples *primers* sobre *ABL1*, de forma tal de poder cubrir toda la longitud del *cluster* y acotar así la región involucrada en cada paciente particular [Waller *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 2010; Score *et al.*, 2010; Linhartova *et al.*, 2015].

En el presente trabajo mostraremos un sistema original para la detección rápida y costo-efectiva de la fusión genómica de *BCR/ABL1* en pacientes con LMC basado en PCR inversa de larga distancia (I-LD-PCR, del inglés *Inverse Long Distance PCR*). Nuestro abordaje permitió caracterizar las secuencias específicas involucradas en el evento que dio origen al reordenamiento *BCR/ABL1* y su recíproco, permitiendo elaborar hipótesis acerca de los mecanismos potencialmente involucrados en la translocación entre los cromosomas 9 y 22. Más importante aún, esta metodología nos permitió diseñar reacciones PCR *BCR/ABL1* de tamaño estándar paciente-específica sobre ADN genómico, de alta sensibilidad útil para el seguimiento de enfermedad mínima residual, en simultáneo con la evaluación del nivel del transcripto *BCR/ABL1*.

Objetivos

Objetivo General

Analizar en la LMC las deleciones submicroscópicas en 9q34 y caracterizar los puntos de ruptura del reordenamiento *BCR/ABL1* y su recíproco, utilizando técnicas de biología molecular e hibridación *in situ* (FISH); a fin de investigar la pérdida de genes supresores de tumor y su posible utilidad en el monitoreo de enfermedad mínima residual a nivel genómico.

Objetivos específicos

- Clasificar la población de pacientes al diagnóstico con LMC mediante sus características, clínicas, citogenéticas, citomoleculares y de expresión molecular cualitativa y cuantitativa de *BCR/ABL1*.

- Analizar en pacientes con LMC la frecuencia y extensión de las deleciones submicroscópicas correspondientes a la región 5' *ABL* y 3' *BCR* sobre el der(9) adquiridas simultáneamente o a *posteriori* de producida la t(9;22)(p34;q11).

- Determinar la región asociada a potenciales deleciones generadas sobre el der(9) y su relación con haploinsuficiencia en *locus* de genes supresores (*ASS1* y *PTGES* en 9q34 y *SMARCB1* en 22q11).

- Desarrollar un nuevo abordaje experimental (I-LD-PCR) para la caracterización de los puntos de ruptura del reordenamiento genómico *BCR/ABL1* y su recíproco *ABL1/BCR* para el seguimiento de enfermedad mínima residual sobre muestras de ADN.

- Estimar el mecanismo molecular que da origen a los rearreglos *BCR/ABL1* y su recíproco *ABL1/BCR* mediante el análisis informático de los sitios de ruptura.

Materiales y Métodos

Poblaciones y muestras.

La población estudiada incluye 61 muestras de pacientes con LMC al momento del diagnóstico y en sucesivos controles del tratamiento con inhibidores de tirosina kinasa (ITKs), y 20 muestras de individuos sin enfermedad como control. Los análisis citogenéticos (citogenética convencional y citogenética molecular) fueron realizados a partir de médula ósea (1-3 ml) aspirada con el anticoagulante heparina, y los análisis de biología molecular (aplicados sobre muestras de ADN genómico y ARN total), fueron realizados a partir de sangre periférica (SP) extraída con el anticoagulante EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético). Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado teniendo en cuenta los requisitos éticos, legales y jurídicos establecidos en las normas bioéticas nacionales e internacionales de las buenas prácticas clínicas. En todo momento se preservó el anonimato de los pacientes. Las muestras biológicas fueron extraídas por médicos hematólogos y derivadas a nuestro laboratorio para efectuar los estudios de investigación propuestos como está explicitado en dicho consentimiento.

Cultivos y preparaciones cromosómicas.

Se realizaron cultivos cortos (24 horas) de médula ósea (MO) a fin de obtener los preparados cromosómicos según los protocolos descritos por Le Beau y Czepulkowski *et al.* [Le Beau, 1991; Czepulkowski *et al.*, 1992] con algunas modificaciones (anexo protocolos: protocolo 1, protocolo 2 y protocolo 3). Los extendidos cromosómicos fueron utilizados para el análisis citogenético por bandeo G y para el análisis de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, del inglés, *fluorescent in situ hybridization*).

Extracción de ARN total

A partir de una muestra de SP (5ml) anticoagulada con EDTA, se lisaron los glóbulos rojos mediante sucesivos lavados con buffer RCLB (del inglés, *red cells lysis buffer*) para obtener el *pellet* de glóbulos blancos (protocolo 4). Obtenido el *pellet* celular, se re suspendió en Trizol (TRIZOL® RNA Isolation Reagents, Life Technology) y se almacenó en freezer (-20° C) hasta realizar la extracción de ARN (protocolo 5). Una vez realizada la extracción, la concentración del ARN extraído fue estimada por espectrofotometría UV (protocolo 6).

Extracción de ADN genómico

A partir de una muestra de SP (5ml), se realizó la lisis de glóbulos rojos con sucesivos lavados con RCLB (protocolo 4). El *pellet* obtenido fue resuspendido en ADNzol (DNAzol® Reagent, Life Technology) y extraído bajo las recomendaciones provistas por el fabricante con algunas modificaciones (protocolo 7). Alternativamente, se aplicó, el sistema de extracción de fenol-cloroformo y precipitación alcohólica estándar (protocolo 8).

La concentración, pureza y calidad (integridad) del ADN extraído fue evaluada mediante espectrofotometría UV (espectrofotómetro GeneQuant pro) (protocolo 6) y electroforesis en gel de agarosa al 0,8-1%.

Métodos de análisis

- Análisis citogenéticos

Bandeo G

Los preparados citogenéticos fueron sometidos a digestión enzimática (proteólisis con tripsina) para la obtención de bandas G (protocolo 9) a fin de identificar y caracterizar alteraciones cromosómicas de los clones neoplásicos. En cada caso se analizaron 20 metafases según los criterios recomendados por el ISCN 2013 [Shaffer *et al.*, 2013].

Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

Los preparados citogenéticos también fueron sometidos a análisis por FISH. Se utilizaron sondas *locus* específicas con estrategia de doble fusión/doble color (LIVE Probes, Lexel *In Vitro*) (protocolo 10) para las regiones cromosómicas 9q34 (gen *ABL1*, rojo) y 22q11 (gen *BCR*, verde) (figura 1). Éste método es óptimo para detectar la presencia del gen quimérico *BCR/ABL1* [t(9;22)(q34;q11)] tanto en células interfásicas como en metafases, mejorando la sensibilidad de las técnicas citogenéticas de bandeo. Además, la estrategia doble fusión/doble color permite detectar la presencia de grandes deleciones sobre el cromosoma derivado 9 [der(9)] al identificar diferencias en los patrones de señal esperados para la t(9;22) clásica (figura 2). Los casos positivos para un patrón compatible con deleciones sobre el der(9) fueron además analizados con un sistema de sondas de doble fusión/doble color

(CytoCELL Aquarius probes) para validar y confirmar las deleciones detectadas mediante los sistemas de análisis descritos anteriormente (protocolo 10).

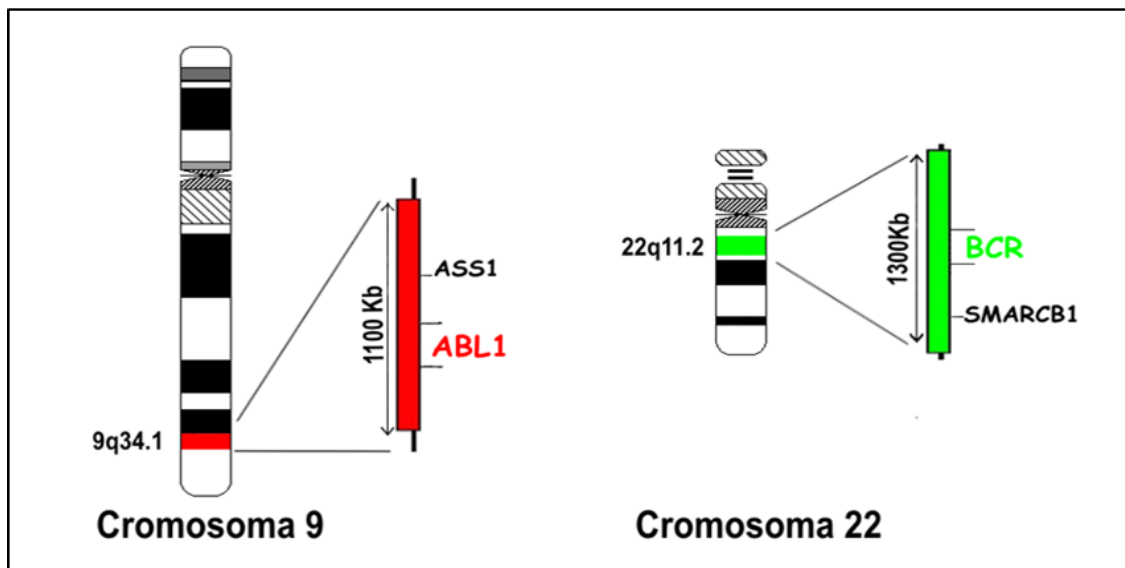


Figura 1. Ideogramas de los cromosomas 9 y 22. Se muestran las regiones donde hibridan las sondas de FISH para poner en evidencia la translocación t(9;22)(q34;q11). En rojo, se indica la sonda para el gen *ABL1* en la región 9q34 sobre el cromosoma 9, en verde, la sonda del gen *BCR* en la región 22q11 sobre el cromosoma 22. También se señalan los genes *ASS1* y *SMARCB1* en el #9 y #22 respectivamente.

- Análisis moleculares

Retrotranscripción (RT) del ARN

Los análisis de expresión fueron realizados a partir de ADNc obtenido por retrotranscripción a partir de ARN total por dos métodos alternativos: (a) para la obtención de ADNc total se usó el método de *random hexamer multipriming* (o alternativamente oligo-dT para enriquecer en las regiones 3' del gen), y (b) para obtención de ADNc enriquecido en un transcripto en particular, se utilizaron *primers* antisentido *locus*-específicos. En ambos casos el material de partida fue ARN total (1000ng) que fue sometido a una desnaturalización por temperatura seguida de retro-transcripción a ADNc con transcriptasa reversa MMLV (protocolo 11).

La primer evaluación de la calidad del ARN total extraído, su retro-transcripción y obtención del ADNc total fue realizada por amplificación PCR del gen codificante para Beta-Actina (gen de referencia con expresión constitutiva y mínima variación cuantitativa, *housekeeping gene*). Este ADNc total fue usado para realizar los análisis de expresión de *BCR/ABL1*, *ABL1/BCR*, *ASS1*, *SMARCB1* y *PTGES*.

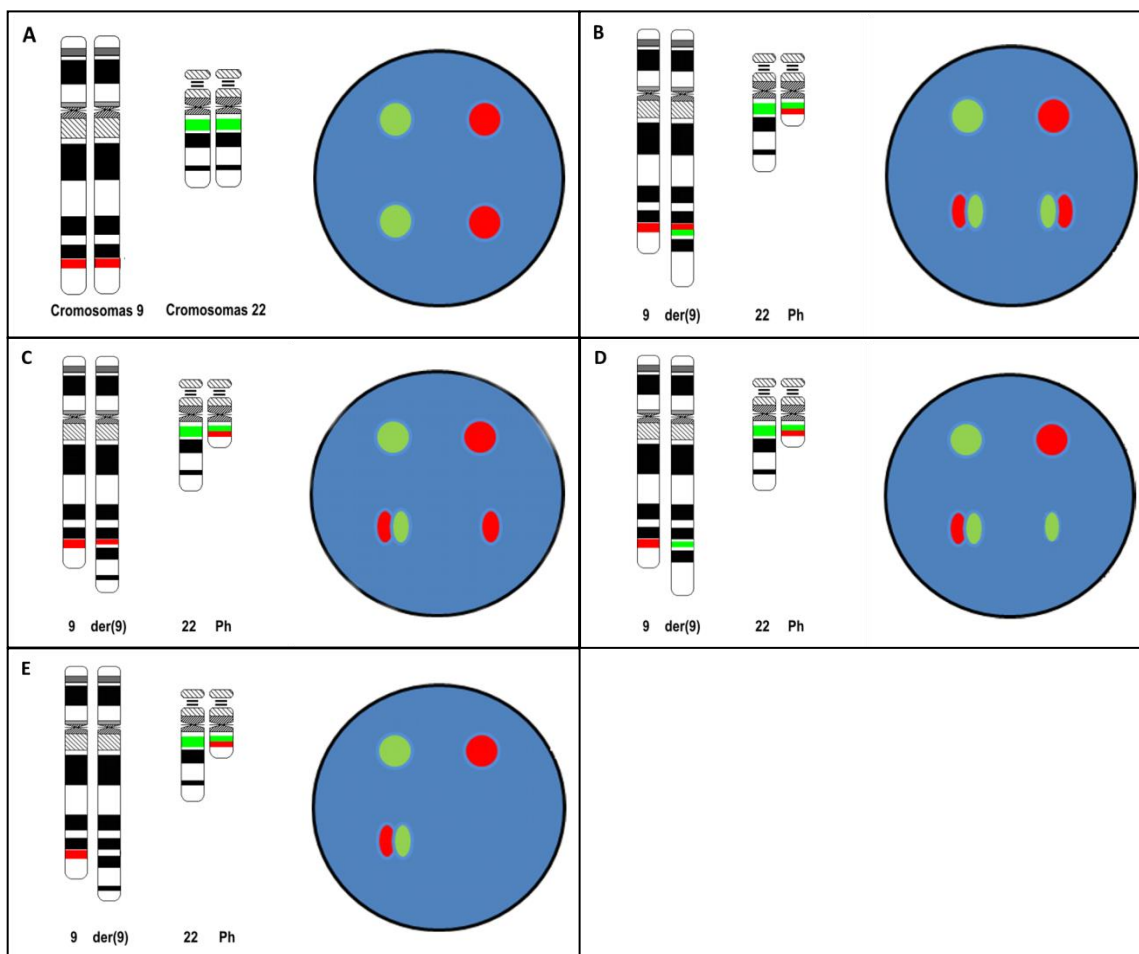


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes patrones posibles encontrados con FISH *BCR/ABL1* en pacientes con LMC Ph positiva. **A:** patrón de señales normal, negativo para el cromosoma Ph [2 señales rojas (cromosomas 9, *locus ABL1*); 2 señales verdes (cromosomas 22, *locus BCR*)]. **B:** patrón de señales observado para casos Ph (+) positivos sin deleciones sobre el der(9) (2 señales de fusión rojo/verde correspondientes al der(9) y al cromosoma Ph, 1 señal roja [cromosoma 9 (*ABL1*)] y 1 señal verde [cromosoma 22(*BCR*)] no involucrados en la translocación. **C:** patrón de señales observado para los casos Ph (+) positivos con deleciones de la porción *BCR* sobre el der(9); 1 señal de fusión rojo/verde correspondiente al cromosoma Ph, 2 señales rojas, una del cromosoma 9 (*ABL1*) no translocado y la restante correspondiente a la porción *ABL1* del der(9) y 1 señal verde correspondiente al cromosoma 22 (*BCR*) no involucrado en la translocación. **D:** patrón de señales observado para casos Ph (+) positivos con deleciones de la porción *ABL1* sobre el der(9); 1 señal de fusión rojo/verde correspondiente al cromosoma Ph, 2 señales verdes, una del cromosoma 22 (*BCR*) no translocado y la restante correspondiente a la porción *BCR* del der(9) y 1 señal roja correspondiente al cromosoma 9 (*ABL1*) no translocado. **E:** patrón de señales observado para casos Ph (+) positivos con deleciones tanto de la porción *ABL1* como *BCR* sobre el der(9); 1 señal de fusión rojo/verde correspondiente al cromosoma Ph, 1 señal verde del cromosoma 22 (*BCR*) no translocado y 1 señal roja correspondiente al cromosoma 9 (*ABL1*) no translocado.

-- Análisis cualitativos de la expresión génica

PCR de *Beta-Actina I*

El gen de *β-Actina I* (NC_000007.14) es un gen de expresión ubicua, característica que nos permitió el desarrollo de una PCR control (protocolo 12) cuyo

producto (317 pb) se utilizó con el objetivo de evaluar la calidad del ARNm empleado en la retrotranscripción evitando el uso de muestras de ARN degradado o de mala calidad en los análisis de expresión génica.

PCR *nested* (anidada) de *BCR/ABL1*

Con el objetivo de determinar con alta sensibilidad la expresión transcripcional *BCR/ABL1* en cada muestra, se realizó la amplificación del gen quimérico *BCR/ABL1* con sistema *nested*, donde la segunda ronda también consiste en una amplificación *BCR/ABL1* específica a partir del producto obtenido en la primera ronda de PCR con *primers* internos (protocolo 13) [van Dongen *et al.*, 1999].

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% con coloración de bromuro de etidio. Los productos específicos de la isoforma b2-a2 fueron de 284 pb y los de b3-a2, de 360 pb (figura 3).

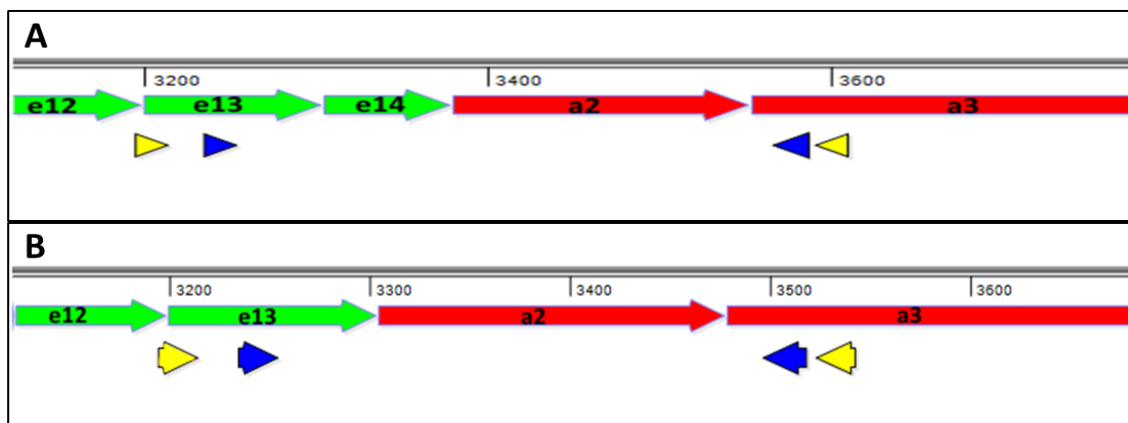


Figura 3. Representaciones esquemáticas de las dos diferentes isoformas encontradas para *BCR/ABL1* p210 en pacientes con LMC Ph positivos. En verde los exones 12, 13 y 14 del gen *BCR* (e12, e13 y e14), y en rojo los exones 2 y 3 del gen *ABL1* (a2 y a3). Los triángulos amarillos representan los *primers* externos empleados en el primer *round* de PCR. En azul, los *primers* internos de la segunda vuelta (re-amplificación) que aumenta la sensibilidad de la técnica (límite de detección) de 100 a 1000 veces. **A:** Isoforma b3-a2 (360 pb) que incluye el exón 14 (o b3) en el gen quimérico *BCR/ABL1*. **B:** Isoforma b2-a2 (284 pb), de menor tamaño que el producto de b3-a2, ya que esta isoforma excluye el exón 14 (o b3) en el gen quimérico.

PCR *nested* de *ABL1/BCR*

Este análisis se llevó a cabo en conjunto con los análisis de FISH, con la finalidad de determinar el estatus delecionado/no delecionado del der(9), ya que patrones de señal de FISH compatibles con deleciones, deberían presentar ausencia de expresión del gen quimérico recíproco *ABL1/BCR*. La ausencia de expresión de

este gen quimérico recíproco *ABL1/BCR* en casos donde los patrones de FISH no coinciden con deleciones sobre el der(9), indicarían casos donde las deleciones son de menor tamaño al límite de resolución del FISH (80-150 kb).

La amplificación del gen quimérico *ABL1/BCR* se realizó por PCR *nested* (protocolo 14), según el diseño de Huntly *et al.* con modificaciones [Huntly *et al.*, 2002]. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

En *ABL1* los dos primeros exones (1b y 1a) están ubicados dentro de la región involucrada en la translocación en el cromosoma 9q34, sin embargo las isoformas *1b-ABL1/BCR* son encontradas en más del 96%, mientras que las isoformas *1a-ABL1/BCR* no superan el 4% de los casos. Ello se debe a que el exón 1a es *spliceado* fuera, mientras que en los pocos casos donde su expresión permanece, ésta es concomitante con la expresión de *1b-ABL1/BCR* [Melo *et al.*, 1993; Melo *et al.*, 1996; Huntly *et al.*, 2002]. Por consiguiente, dado el diseño de *primers*, los productos *ABL1/BCR* fueron de 195 pb en los casos con la isoforma denominada *1b-b4* y de 270 pb, en los casos *1b-b3* (figura 4).

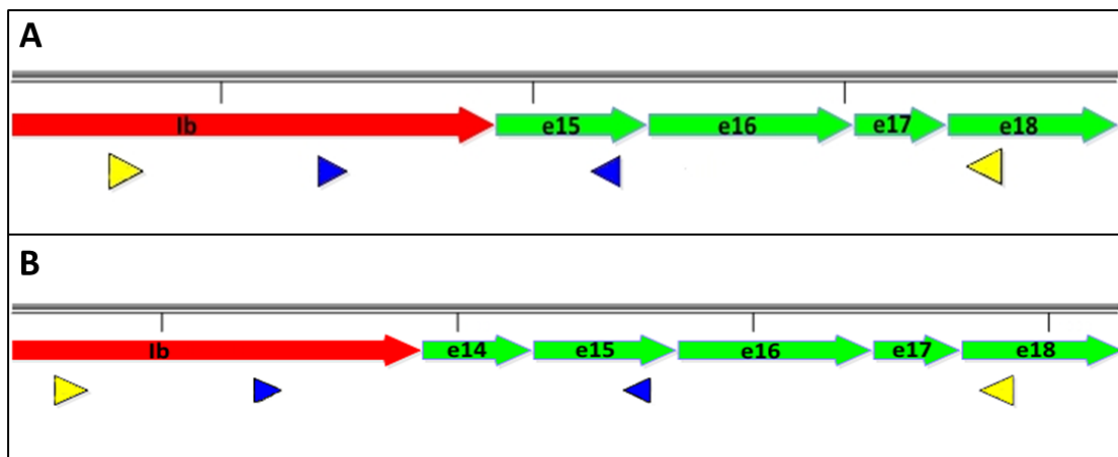


Figura 4. Representaciones esquemáticas de las dos diferentes isoformas recíprocas encontradas para *ABL1/BCR* en pacientes con LMC Ph positivas. En verde los exones 14 al 18 del gen *BCR*; en rojo el exón 1b de *ABL1*. Los triángulos amarillos representan los *primers* más externos empleados en el primer *round* de PCR *nested*. En azul, los *primers* más internos usados en el segundo *round* de amplificación. **A:** Isoforma *1b-b4* (195 pb) esta isoforma excluye el exón 14 (o b3), permaneciendo éste en el gen quimérico *BCR/ABL1*. Por consiguiente, esta isoforma constituye la contraparte de la isoforma b3-a2 de *BCR/ABL1*. **B:** Isoforma *1b-b3* (270 pb). Esta isoforma incluye el exón 14 (o b3) y por ello constituye la contraparte de la isoforma b2-a2 de *BCR/ABL1*.

-- Análisis cuantitativos de la expresión génica (PCR en tiempo real)

Q-RT- PCR *BCR/ABL1*

Este método se usó como parámetro comparativo de los niveles de expresión entre pacientes con deleciones en el der(9) y pacientes sin deleción del gen quimérico *BCR/ABL1*. También nos permitió comparar los niveles de respuesta molecular en ambos grupos en tratamiento con ITKs a los 6 y 12 meses.

La cuantificación relativa de los transcritos *BCR-ABL1* (p210) respecto del gen control *ABL1* se realizó utilizando el sistema comercial Molecular MD (*MolecularMD® One-Step qRT-PCR BCR-ABL kit*) en un equipo Rotor-Gene 6000 Q (QIAGEN). Este sistema está basado en la técnica *taqman* e incluye los *primers* y sondas para cuantificar el reordenamiento *BCR-ABL1* y el gen control *ABL1*. El sistema cuenta con plásmidos en diluciones seriadas que permiten realizar las curvas de calibración para cada gen. Además, ofrece muestras control que equivalen a respuesta molecular nula, mayor y completa. Se emplean 1000ng de ARNm extraído de leucocitos de SP (protocolo 5). Los valores obtenidos están expresados en escala internacional y el factor de conversión (FC) de nuestro laboratorio fue calculado inicialmente mediante el envío de muestras al *Institute of Medical and Veterinary Science*, laboratorio de referencia en Adelaida, Australia [Hughes *et al.*, 2003]. A partir del 2014 el factor de conversión se obtiene a partir de la utilización de los calibradores primarios provistos por la Organización Mundial de la Salud (WHO). El FC=0,7 obtenido para nuestro laboratorio es validado anualmente, teniendo en cuenta las recomendaciones internacionales.

- Q-RT- PCR de Genes Supresores de Tumor (GSTs): *ASS1*, *SMARCB1* y *PTGES*

Se realizó la cuantificación del nivel de expresión de los genes *ASS1*, *PTGES* y *SMARCB1* en pacientes con y sin deleciones sobre el der (9) a fin de investigar la potencial haploinsuficiencia de dichos genes. Se utilizó el método SYBR Green y el equipo Rotor-Gene Q 6000 de QIAGEN. Este sistema de cuantificación está basado en la presencia de una molécula (*SYBRGreen*) que emite fluorescencia estequiométricamente (a la longitud de onda de 530 nm) cuando se intercala en un producto de ADN de doble cadena. La especificidad de los productos de amplificación Q-RT-PCR obtenidos se analizaron por investigación de su temperatura de

desnaturalización media (análisis de *melting*) en el mismo termo-ciclador para verificar la ausencia de productos inespecíficos que pudieran alterar la calidad de la estimación cuantitativa. Las curvas de calibración para cada gen en estudio se realizaron con diluciones seriadas del ADNc de la línea K562 (línea celular Ph positiva de alta expresión de *BCR/ABL1* derivada de una paciente con de LMC [Lozzio & Lozzio, 1975]). Como gen control (*housekeeping*) o referencia se utilizó el gen de β -Actina I (protocolos 16, 17, 18 y 19). La cuantificación relativa final de cada transcripto se realizó con el método $2^{-\Delta CT}$ [Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008].

-- Análisis genómicos

I-LD-PCR (PCR Inversa de Larga Distancia, del inglés *Inverse Long Distance PCR*) de *BCR/ABL1*

El *cluster* de ruptura del gen *BCR* involucrado en la LMC (*M-BCR*, del inglés *Mayor Breakpoint Cluster Region*), acotado a un tamaño de 3,1 kb, está flanqueado por sitios de restricción *Bcl I* (sitios de restricción A y D) (figura 5). Esta característica, nos permitió diseñar un abordaje de PCR inversa en condiciones de larga distancia I-LD-PCR (aunque el tamaño de los eventuales productos de los rearrreglos genómicos entre *BCR* y *ABL1* son desconocidos, se aplican condiciones de larga distancia para cubrir el mayor rango de tamaños de amplificación posible, e.g., de <1 kb a >10 kb) para la amplificación específica y caracterización, en principio, de los eventuales rearrreglos directo *BCR/ABL1* y recíproco *ABL1/BCR* sobre ADN genómico en pacientes con LMC.

El ADN genómico de leucocitos de SP fue digerido con la enzima *Bcl-I* (protocolo 20) y purificado (protocolo 21). Los fragmentos *Bcl I* fueron ligados entre sus extremos cohesivos, en alta dilución, para formar círculos de ADN, círculos-*Bcl I* (enzima T4 ADN *ligasa*) (protocolo 22). En esta etapa, el uso de grandes volúmenes de reacción, favorece la auto-ligación de cada molécula lineal de ADN sobre sus dos puntos de corte *Bcl-I* resultando en un aumento de la tasa de formación de ADN circular o monómeros (ligación intra-fragmentos) respecto del ADN lineal o concatémeros (ligación inter-fragmentos) [Rossetti *et al.*, 2008].

El ADN circularizado fue purificado (protocolo 23) y sometido a una reacción de PCR de larga distancia (LD-PCR) usando *primers* divergentes característicos del abordaje de PCR inversa (i.e., orientados cola-cola se re-orientan cabeza-cabeza

como resultado de la circularización) que tienen como blanco la secuencia orientada hacia el sitio de restricción *Bcl-I* aguas arriba de *M-BCR* (*primer A*) y sobre la secuencia del intrón 12 de *BCR* cercana y orientada hacia *M-BCR* (*primer B*, figura 5). De esta forma, una vez circularizado el fragmento de restricción específico del flanco aguas arriba del clúster *M-BCR*, los *primers* pueden amplificar el eventual rearreglo *BCR/ABL1* y la región de ruptura genómica involucrada en la translocación (protocolo 24, figura 6).

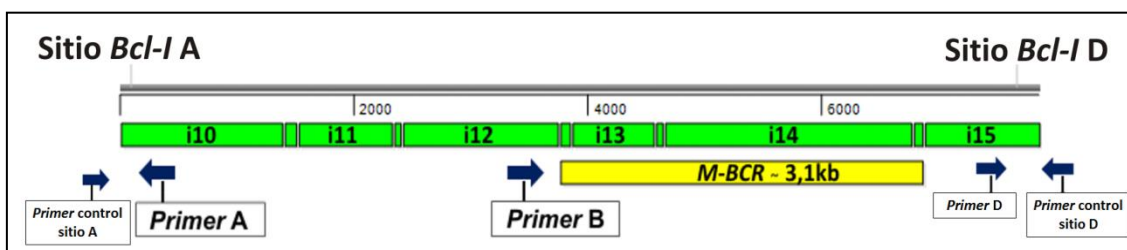


Figura 5. Representación esquemática parcial de *BCR* línea germinal que muestra los intrones involucrados en el clúster de ruptura *M-BCR*, los sitios de restricción *Bcl I* que flanquean al clúster y todos los *primers* usados en la caracterización mediante I-LD-PCR. Cajas verdes: intrones 10-15 (y exones 11-15 intercalados) de *BCR*. Caja amarilla: clúster *M-BCR* (abarca los intrones 13 y 14, 3,1 kb), involucrado en la formación del gen quimérico *BCR/ABL1* en LMC. Flechas azules: *primers*.

Como análisis complementarios de control de los sitios de restricción, se diseñaron *primers* para la amplificación por PCR convencional y verificación de las secuencias que comprenden los dos sitios de restricción *Bcl-I* que flanquean el clúster *M-BCR* (*primers* de control del sitio A, *primer D* y *primer* de control de sitio D; protocolo 25; figura 5). Además, estos mismos *primers* en combinación, nos permitieron controlar la efectiva circularización del fragmento de restricción *Bcl-I* específico que contiene el *M-BCR* mediante PCR inversa (I-PCR, *primers A + D*; protocolo 26; figura 6).

Una vez circularizado el fragmento de restricción específico que contiene el clúster *M-BCR*, la I-LD-PCR dará como producto una señal de 4,3 kb. Esta señal, es la señal esperada para el gen *BCR* en la línea germinal (LG) o *wild type* (WT) (no-rearreglado).

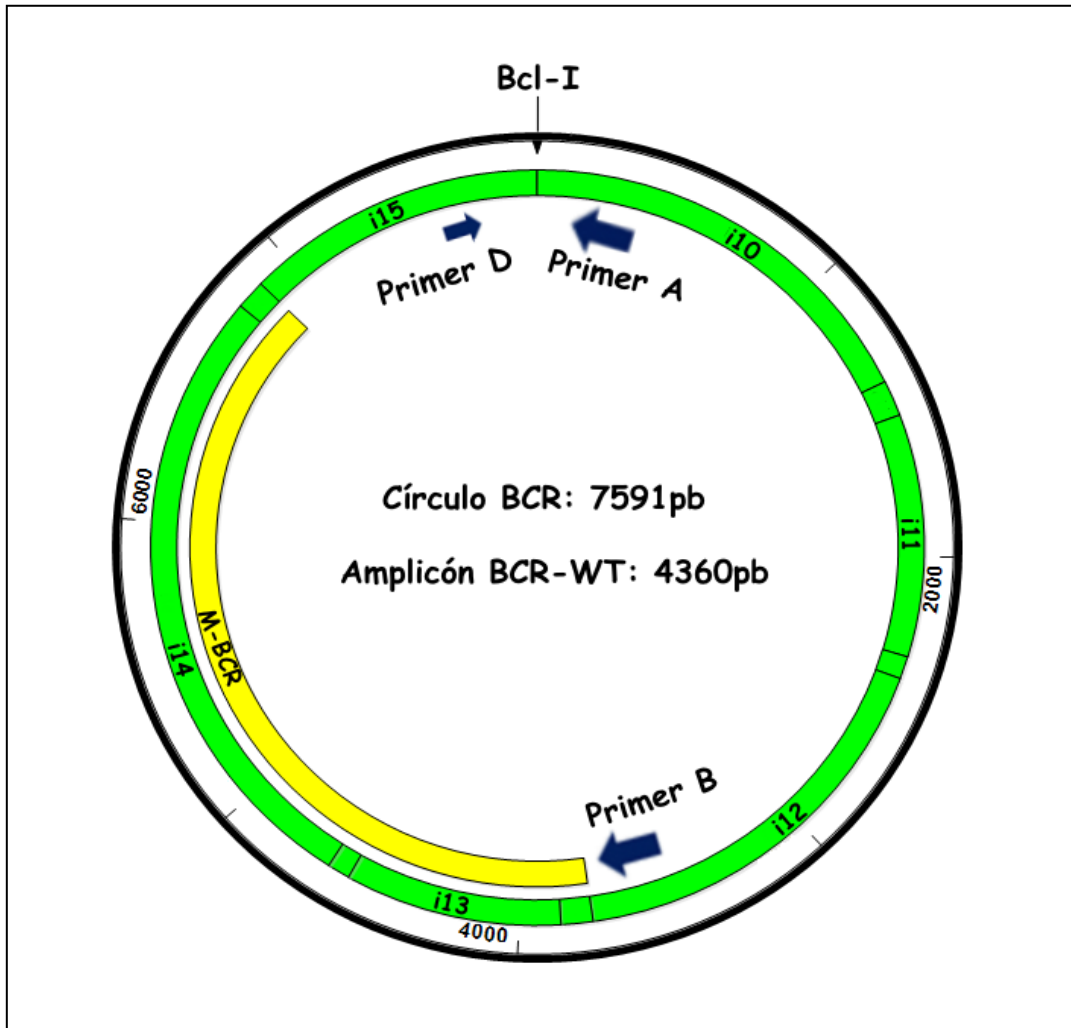


Figura 6. Representación esquemática del fragmento de restricción circularizado que contiene al M-BCR no rearrreglado (línea germinal). Se identifica la posición de los *primers* A y B que mediante I-LD-PCR amplifica específicamente el sitio de ruptura de la translocación. El *primer* D, junto al A nos permite controlar la efectiva circularización del ADN por PCR convencional. Cajas verdes: intrones 10-15 (y exones 10-14 intercalados) del gen *BCR*. Caja amarilla: clúster de rupturas *M-BCR* (intrones 13 y 14, y exón 13 intercalado; 3,1 kb). Flechas azules: *primers*.

La enzima de restricción *Bcl-I* reconoce secuencias de 6 pb (TGATCA), lo que permite estimar fragmentos promedio de 4.096 pb (probabilidad de restricción una cada 4⁶). En el gen *ABL1* la región involucrada en la translocación que da origen a *BCR/ABL1* es de aproximadamente 150 kb. Una enzima como *Bcl-I* que predice un sitio de corte en promedio cada 4 kb y permite estimar 38 sitios, aunque el mapa de restricción indica 43 sitios en la región potencialmente involucrada en *ABL1* (figura 7).

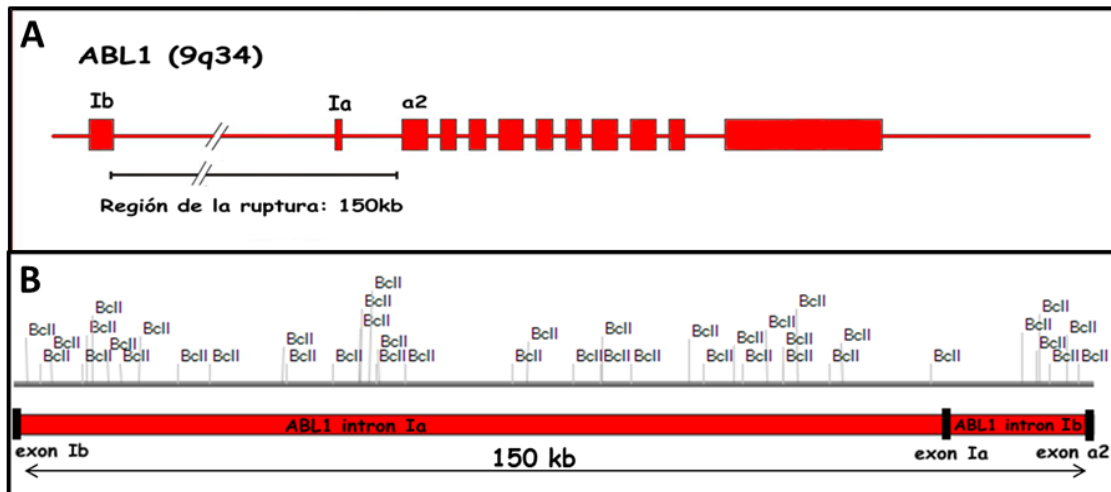


Figura 7. A: Representación esquemática del gen *ABL1*. La región involucrada en la translocación (región de ruptura) tiene aproximadamente 150 kb y corresponde a los dos primeros intrones (intrón 1a e intrón 1b). Cajas rojas: exones 1a - 1b del gen *ABL1*. **B:** Detalle de la región de ruptura de *ABL1* que muestra el mapa de restricción de *Bcl-I* en estos intrones. Cajas rojas: intrones 1a y 1b. Cajas negras: exones 1b, 1a y a2.

En el caso de pacientes con LMC portadores del rearrreglo *BCR/ABL1* y suponiendo que cualquier punto en esas 150 kb es un blanco posible de sufrir una ruptura, una vez realizada la digestión enzimática *Bcl-I* y la circularización, el tamaño del rearrreglo *BCR/ABL1* será diferente de la señal *BCR* de línea germinal (figura 6), y estará en función de la longitud del sitio de restricción *Bcl-I* río abajo, más próximo al punto de ruptura de *ABL1* (figuras 8 y 9). Por consiguiente, las variaciones de tamaño en el patrón de productos de I-LD-PCR sobre la señal de *BCR-LG* (4,3 kb), reflejarán la presencia de segmentos del gen *ABL1* resultado de la translocación entre los cromosomas 9 y 22 y contendrán el punto de ruptura genómico de *BCR/ABL1* para hacer su caracterización.

Es por esto que, para cada paciente con LMC se esperan, teóricamente, al menos dos productos I-LD-PCR con el esquema de amplificación aplicado (*primers* A y B). Una señal de 4,3 kb correspondiente a la señal de línea germinal del gen *BCR* no rearrreglada (*wild type*), común a todos los casos y una segunda señal, de tamaño desconocido, que corresponderá al gen quimérico *BCR/ABL1* virtualmente distinta en cada paciente, sobre todo por la contribución de un punto al azar en una región de 150 kb en *ABL1*, a diferencia de los ARN mensajeros de fusión que están compartidos por grandes grupos de pacientes (e.g., b2-a2, b3-a2).

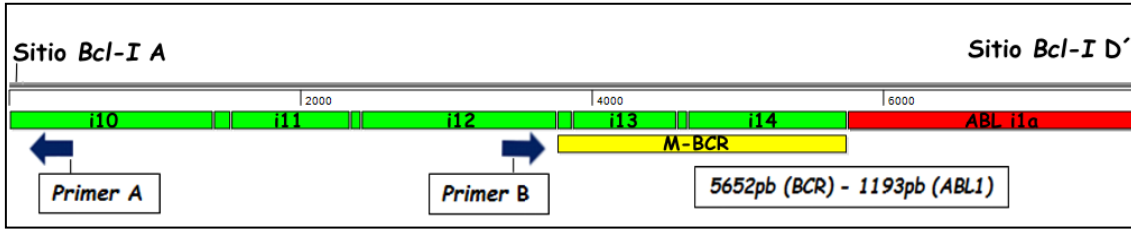


Figura 8. Representación esquemática parcial de un posible rearreglo *BCR/ABL1* (lineal). Se muestran los intrones involucrados (intrón 14 de *BCR* e intrón 1a de *ABL1*) y los sitios de restricción *Bcl-I*, uno río arriba que flanquea a *BCR* (sitio A), y uno río abajo, inmediatamente cercano al punto de ruptura sobre *ABL1*. En este ejemplo hipotético, el rearreglo *BCR/ABL1* resulta en un fragmento de restricción de 6.845 pb (5.652 pb sobre *BCR* desde el sitio de restricción A hasta el punto de ruptura, más 1.193 pb sobre *ABL1* desde el sitio de ruptura hasta el sitio de restricción más cercano (sitio D')). Se muestran la posición de los *primers* A y B (flechas azules) para la amplificación I-LD-PCR. Cajas verdes: intrones 10-15 de *BCR*. Caja amarilla: clúster de ruptura M-BCR (intrones y exones 13 y 14 de *BCR*; 1,9 kb). Caja roja: intrón 1a de *ABL1* (1,1 kb).

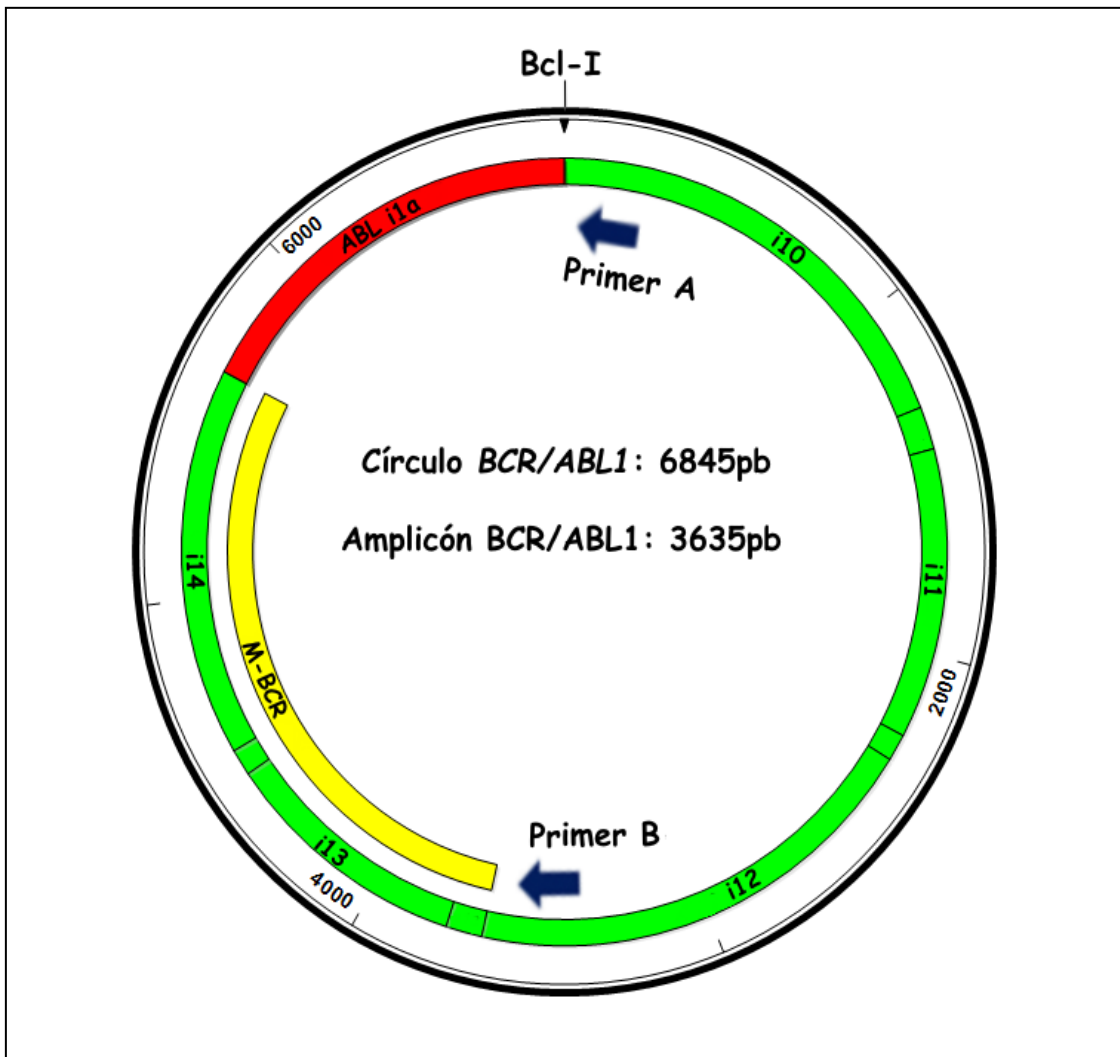


Figura 9. Representación esquemática del mismo fragmento de restricción *Bcl-I* que contiene a los puntos de ruptura del gen *BCR/ABL1* mostrado en la figura 8 circularizado. Se identifican la posición de los *primers* A y B para amplificar por I-LD-PCR los sitios de ruptura del rearreglo

BCR/ABL1 independientemente de su posición exacta sobre *ABL1*. Los códigos de color de cada estructura son iguales a los de la figura 8.

Los rearrreglos *BCR/ABL1* y *ABL1/BCR in silico* fueron caracterizados para cada paciente a partir de los productos de PCR directa, relevantes por secuenciación de Sanger y alineación sobre el genoma de referencia (i.e., GRCh38, *the Genome Reference Consortium Human genome (build 38)*). Las secuencias obtenidas permitieron el diseño de un segundo conjunto de *primers* caso-específicos para amplificación por PCR estándar. En cada caso se diseñaron 6 *primers*: 3 para la amplificación de *BCR* y *BCR/ABL1*, y 3 para *ABL1* y *ABL1/BCR*, en un sistema de *multiplex* usando el mismo primer *forward* para cada *locus* del lado 5' del rearrreglo (i.e., *BCR* y *ABL1*, respectivamente) para amplificar simultáneamente las señales de línea germinal (LG) y rearrreglada en ADN genómico del paciente (figuras 10 y 11)

Los productos de amplificación fueron re-secuenciados por el método de Sanger a fin de confirmar las secuencias involucradas en los puntos de ruptura de cada paciente (secuencias de *BCR-LG*, *BCR/ABL1*, *ABL1-LG* y *ABL1/BCR*).

Se determinaron las secuencias específicas de *BCR-LG*, *BCR/ABL1*, *ABL1/BCR* y *ABL-LG* en cinco pacientes y *BCR-LG*, *BCR/ABL1* y *ABL-LG* en un caso más (protocolos 27-38). Esta caracterización permitió la evaluación y análisis *in silico* de las secuencias involucradas en la t(9;22) en búsqueda de motivos recombinogénicos o *hot spots* en el extendido "*cluster*" de *ABL1*.

Asimismo, se analizó la aplicación de la PCR-paciente específico (PCR-PE) de *BCR/ABL1* genómico como herramienta de seguimiento de la enfermedad mínima residual (EMR) en conjunto con la qPCR *BCR/ABL1* en cuatro de los pacientes descritos anteriormente.

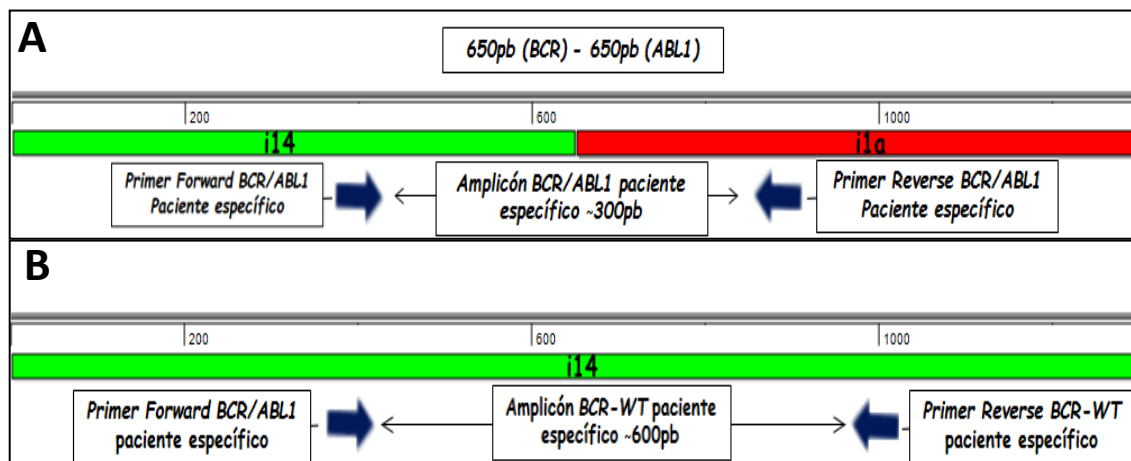


Figura 10. Esquema de un posible (hipotético) rearrreglo *BCR/ABL1* caso-específico (mostrado en su estructura lineal) y el abordaje para su amplificación directa (y caracterización de los puntos de ruptura involucrados) sobre ADN genómico de un paciente con LMC. Se muestran el intrón 14 de *BCR* y el intrón 1a de *ABL1*. Los 3 *primers* (flechas azules) (un *forward* sobre *BCR* y dos *reverse* sobre *BCR* y *ABL1*) permiten la amplificación simultánea por PCR *multiplex* del rearrreglo *BCR/ABL1* (cromosoma *Philadelphia*) y *BCR-LG* (cromosoma 22 no translocado). A: Esquema del rearrreglo *BCR/ABL1* (e.g., 1.300 pb, 650 pb sobre *BCR* y 650 pb sobre *ABL1*) en el que se incluye el punto de ruptura de la translocación y la posición hipotética de los *primers* generando un producto de 300 pb. B: Esquema del intrón 14 de *BCR* del gen no rearrregado en el cromosoma 22 (Esquema del intron 14 del gen *BCR* no rearrregado). En el esquema el mismo *primer forward* mostrado en A de *BCR* y un *primer reverse* sobre la región *BCR* río abajo del rearrreglo amplifica un producto PCR específico del gen *BCR wild type* (e.g., 600 pb). La diferencia de tamaños diseñada en los productos PCR sirve para discriminar las señales en un sistema de PCR *multiplex*. Los códigos de color son iguales a los de la figura 8.

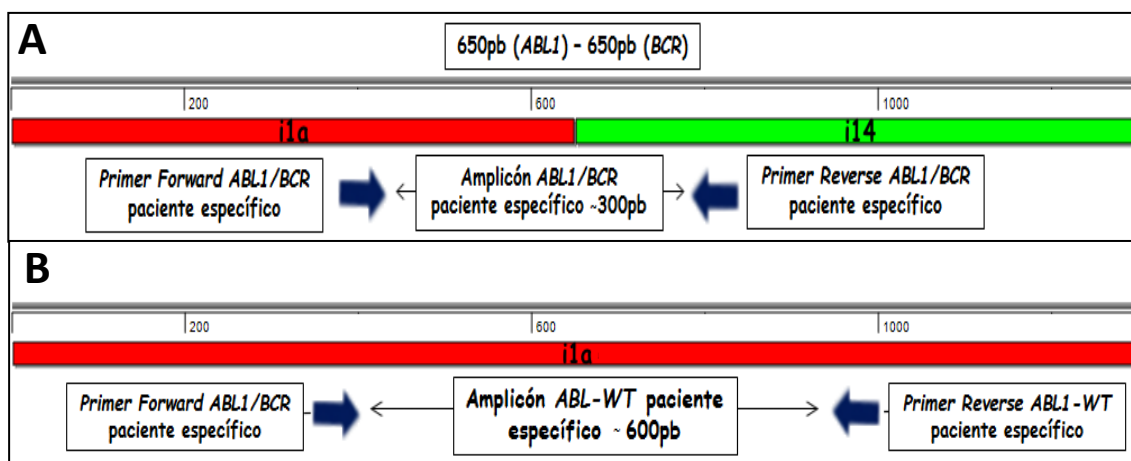


Figura 11. Esquema molecular del rearrreglo recíproco *ABL1/BCR* un caso-específico hipotético que es la contraparte del esquema presentado en la figura 10. Se muestran el intrón 1a del gen *ABL1* y el intrón 14 de *BCR*. Como en el caso de *BCR/ABL1*, los tres *primers* amplifican por PCR *multiplex* el rearrreglo *ABL1/BCR* (der(9)) y *ABL-LG* (cromosoma 9 no translocado) simultáneamente. Otra vez, A: esquema de *ABL1/BCR* incluyendo el punto de ruptura de la translocación y los *primers* generando un producto PCR hipotético de 300 pb; y B: esquema de 1.300 pb del intrón 1a de *ABL1* que corresponden al gen no rearrregado en el cromosoma 9 y posición de mismo *primer forward* que en A y un nuevo *primer reverse* sobre la región de *ABL1* involucrada en el rearrreglo recíproco eventual para amplificar sólo el *ABL1-LG* (600 pb), diferencia de tamaños en los productos de PCR que los hace fácilmente reconocibles en el ensayo PCR *multiplex*.

-- Programas informáticos

Todas las fotografías y los cariotipos citogenéticos fueron tomadas y armados con el software de análisis citogenético Cytovision 6.1 (Leica Microsystems, San Jose Corp). Los ideogramas y las representaciones esquemáticas de los cromosomas se construyeron con la plataforma online: CyDAS Online Analysis Site (URL: <http://www.cydas.org/OnlineAnalysis/>) [Hiller *et al.*, 2004].

Los mapas de restricción *Bcl-I* y el manejo de todas las secuencias de ADN y ARNm *in silico* fueron realizadas usando el programa de manejo de secuencias y anotación, SeqBuilder (LaserGene, DNA Star) sobre la última versión (último acceso el 07/09/2016) de los genes *BCR*, *ABL1*, *ASS1*, *PTGES* y *SMARCB1* (GenBank, GRCh38.p7: NC_000022.11; NC_000009.12). Los *primers* para cada una de las amplificaciones PCR fueron diseñados utilizando el programa PrimerSelect (LaserGene, DNA Star), sobre secuencias de ADN genómico circularizado *in silico* o no circularizado; ARNm de los transcriptos *BCR/ABL1*, *ABL1/BCR*, *ASS1*, *PTGES* y *SMARCB1*. Fueron seleccionados por el *score* del programa y por los tamaños de los productos en función del diseño de cada experimento, y en los casos de los análisis genómicos, sobre los mapas de restricción *Bcl-I* evitando las secuencias repetidas (e.g., Alu, LINE, etc.) accediendo al algoritmo RepeatMasker en línea (URL: <http://www.repeatmasker.org/>).

Las secuencias *BCR/ABL1* obtenidas de la secuenciación automática de los productos de I-LD-PCR fueron verificadas por alineación con la herramienta online BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Todos los análisis y test estadísticos se llevaron a cabo con el software libre INFOSTAT (Grupo InfoStat, UNC, Argentina, URL: <http://www.infostat.com.ar>) [Di Rienzo *et al.*, 2013].

Resultados

Características citogenéticas, cito-moleculares y expresión de *BCR/ABL1* y *ABL1/BCR* en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica.

La serie analizada comprendió un total de 61 pacientes con diagnóstico inicial de LMC en fase crónica. La edad promedio de diagnóstico fue 45,2 años (rango: 15 - 73 años) con un ligero predominio de pacientes masculinos (relación: 1,03 hombres/mujeres).

Las características clínicas y de laboratorio de los pacientes al momento del diagnóstico son mostradas en la tabla 1.

- Análisis citogenético.

La translocación estándar $t(9;22)(q34;q11)$ fue observada en 57 (93,5%) casos (figura 1) mientras que en los 4 (6,5%) casos restantes, el cromosoma Ph fue resultado de translocaciones complejas. Dos casos (3,2%) presentaron además del cromosoma Ph, alteraciones cromosómicas adicionales (ACAs) al momento del diagnóstico (tabla 1).

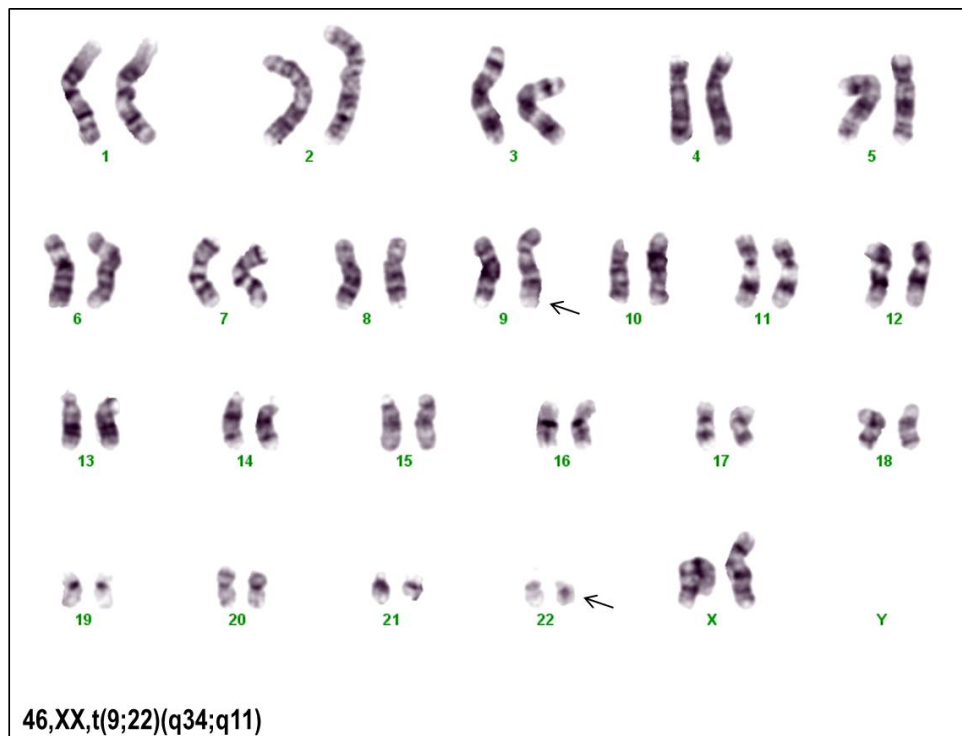


Figura 1: Cariotipo con translocación estándar $t(9;22)(q34;q11)$. Las flechas indican los cromosomas involucrados

Tabla 1. Características clínicas, de laboratorio, citogenéticas y moleculares de pacientes con LMC al diagnóstico.

Características (n=61)	
Sexo (M/F)	31/30 (1,03)
Edad Promedio (rango)	45,2 (15 - 73)
Esplenomegalia [cm]	4,35 (2,4 - 8)*
Conteo Leucocitario [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	146,5 (64 - 251)*
Conteo Plaquetario [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	313,5 (248 - 450)*
Blastos en sangre periférica [%]	3 (2-5)*
Hemoglobina [g/dL]	11,39 (10,5-12,7)*
Índice de SOKAL	
Alto	13/59 (22)**
Intermedio	10/59 (16,9)**
Bajo	36/59 (61,1)**
Tratamiento	
Imatinib	43/61 (70,5)**
Nilotinib	7/61 (11,4)**
Dasatinib	11/61 (18,1)**
Cariotipo	
Ph clásico	57/61 (93,5)**
Ph variante	4/61 (6,5)**
ACAs	2/61 (3,2)**
FISH	
Sin deleciones 9(der)	47/61 (77,1)**
Ph clásico	44/47 (93,6)**
Ph variante	3/47 (6,4)**
Con deleciones 9(der)	14/61 (22,9)**
deleción total	8/14 (57,2)**
deleción parcial	3/14 (21,4)**
múltiples clones	3/14 (21,4)**
BCR/ABL1	
Isoforma b3-a2	41/61 (67,3)**
Isoforma b2-a2	20/61 (32,7)**
ABL1/BCR	
Isoforma 1b-b4	30/61 (49)**
Isoforma 1b-b3	11/61 (18)**
Sin expresión	20/61 (33)**

* Mediana (Rango intercuartilo). ** n (%).

Todos los Ph variantes hallados en nuestro estudio fueron variantes complejas y todos ellos incluyeron cromosomas y puntos de ruptura previamente descritos en la literatura: t(2;9;22)(p23;q34;q11) (figura 2), t(9;21;22)(q34;p11;q11) (figura 3); t(4;9;22)(p14;q34;q11) (figura 4) y t(8;9;22)(q13;q34;q11).

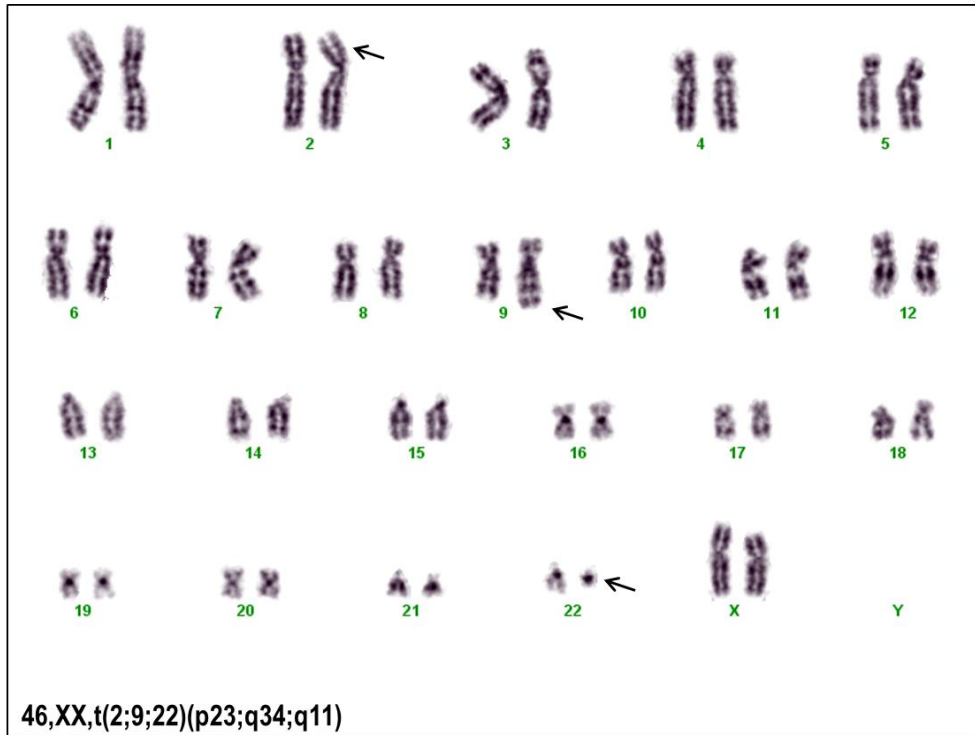


Figura 2: Cariotipo que muestra la translocación variante compleja t(2;9;22)(p23;q34;q11). Las flechas indican los cromosomas involucrados

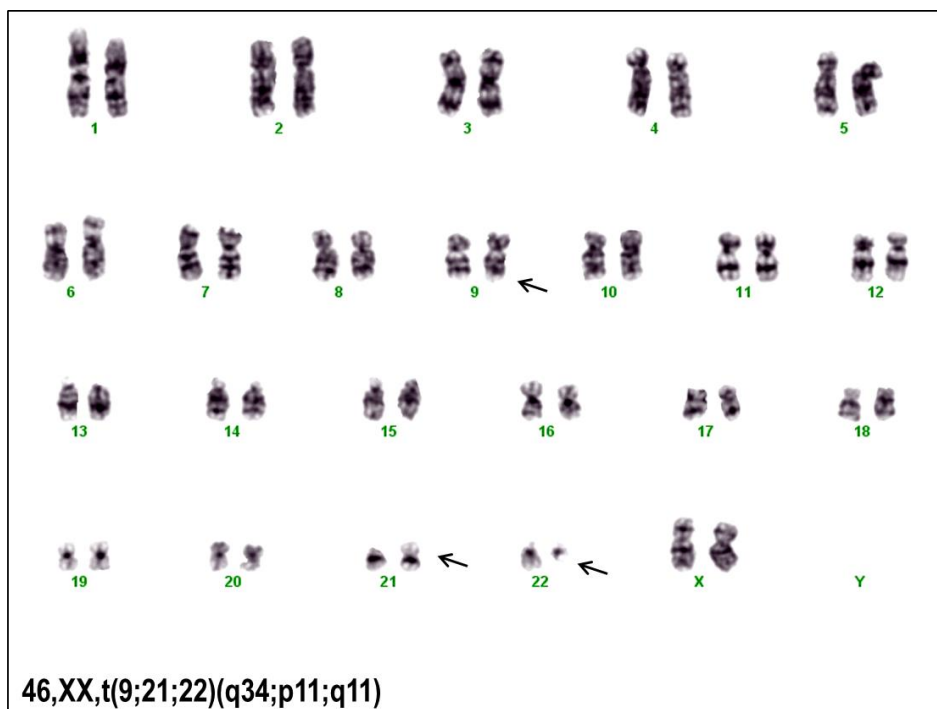


Figura 3: Cariotipo que muestra la translocación variante compleja 46,XX,t(9;21;22)(q34;p11;q11). Las flechas indican los cromosomas involucrados.



Figura 4: Cariotipo que muestra la translocación variante compleja 46,XY,t(4;9;22)(p14;q34;q11). Las flechas indican los cromosomas involucrados.

Los ACAs encontrados fueron una trisomía del cromosoma 8 y una t(13;14)(q12;q31) (tabla 2).

Tabla 2. Cariotipo de pacientes con Ph variantes y con ACAs.

Paciente	Edad/Sexo	Cariotipo
# 10	64/F	46,XX,t(2;9;22)(p23;q34;q11)
# 21	37/F	46,XX,t(9;21;22)(q34;p11;q11)
# 40	63/M	46,XY,t(4;9;22)(p14;q34;q11)
# 46	28/F	46,XX,t(8;9;22)(q13;q34;q11)
# 17	44/M	46,XY,t(9;22)(q34;q11),+8
# 42	61/M	46,XY,t(9;22)(q34;q11),t(13;14)(q12;q31)

- Análisis de FISH *BCR/ABL1*.

El análisis de FISH con sondas *BCR/ABL1* doble color/doble fusión permiten la identificación del rearrreglo *BCR/ABL1* (cromosoma Ph) y su recíproco *ABL1/BCR* (der(9)), así como deleciones sobre el mismo. Además, en los casos con Ph variantes, esta estrategia brinda información sobre el mecanismo de formación involucrado en estas translocaciones.

Del total de pacientes (n=61), 47 (77%) tuvieron un patrón de FISH sin deleciones sobre el der(9). Entre estos casos 44/47 (93,6%) presentaron el reordenamiento *BCR/ABL1* clásico (2 fusiones, 1 rojo, 1 verde) (figura 5) y los 3/47 (6,4%) restantes presentaron un patrón de señales coincidente con translocaciones variantes con un mecanismo de formación de una etapa (1 fusión, 2 rojos, 2 verdes) (figuras 6 y 7).

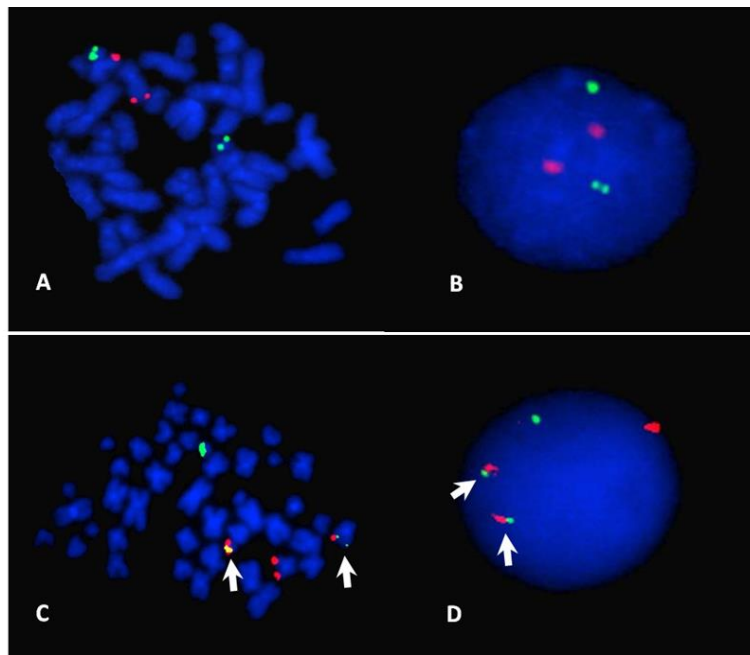


Figure 5: Patrones de FISH encontrados en el análisis. A-B): Metafase e Interfase con patrón de señal negativas para el rearreglo *BCR/ABL1* (2 rojos, 2 verdes). C-D) Metafase e Interfase con patrón de señales clásico para los rearreglos *BCR/ABL1* y *ABL1/BCR* convencionales. Las flechas blancas indican las fusiones correspondientes al rearreglo.

Los 14/61 (22,9%) casos restantes presentaron un patrón de señales compatibles con deleciones sobre el der(9), entre los que estaba también un caso con translocación variante 46,XY,t(4;9;22)(p14;q34;q11) (tabla 1). En estos casos, las deleciones encontradas sobre el der(9) mostraron grandes diferencias en su extensión y diversidad de patrones.

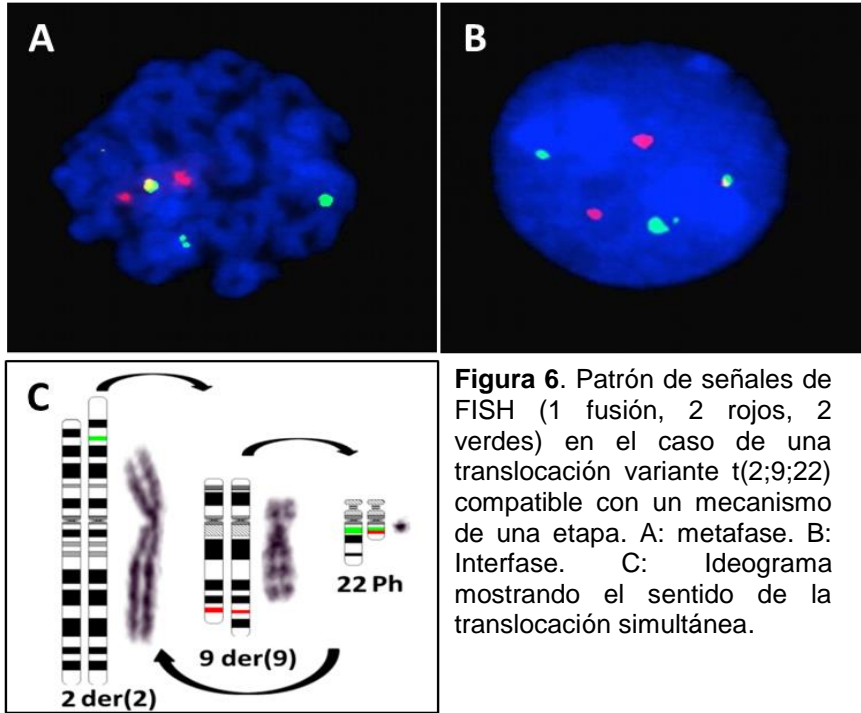


Figura 6. Patrón de señales de FISH (1 fusión, 2 rojos, 2 verdes) en el caso de una translocación variante t(2;9;22) compatible con un mecanismo de una etapa. A: metafase. B: Interfase. C: Ideograma mostrando el sentido de la translocación simultánea.

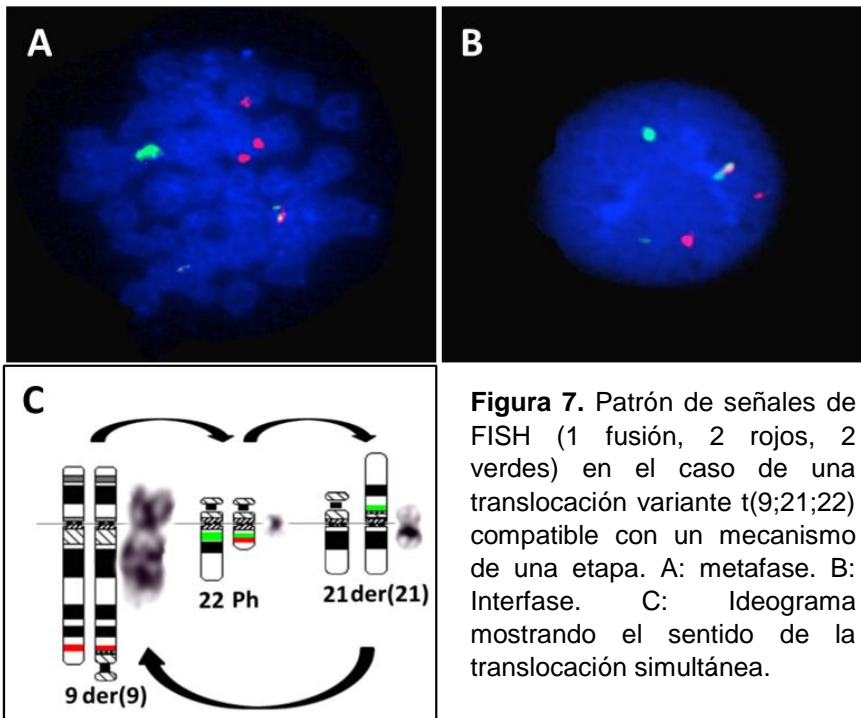


Figura 7. Patrón de señales de FISH (1 fusión, 2 rojos, 2 verdes) en el caso de una translocación variante t(9;21;22) compatible con un mecanismo de una etapa. A: metafase. B: Interfase. C: Ideograma mostrando el sentido de la translocación simultánea.

Ocho de los 14 casos (57%) mostraron un patrón de señales coincidente con una delección de las regiones del cromosoma 9 y 22 asociadas a la fusión recíproca *ABL1/BCR* sobre el der(9) (figura 8). Tres de los 14 pacientes (21,4%) tuvieron delecciones que sólo afectaron secuencias del cromosoma 22 (figura 9) y los tres

restantes (21,4%) presentaron la coexistencia de más de un clon. Entre estos tres últimos, el primero presentó un 68% (204/300 células analizadas) de núcleos con deleciones de las secuencias del cromosoma 22 y un clon minoritario con un patrón de deleción completo sobre el der(9) (71/300, 23,6%) además del componente normal (25/300, 8,4%) (figura 10). El segundo caso presentó un clon mayoritario sin deleciones (188/300, 62,7%) y un clon minoritario con un patrón de deleción completo sobre el der(9) (84/300, 27,9%) además del componente normal (28/300, 9,4%) (figura 11). El tercer caso presentó un clon mayoritario sin deleciones (189/300, 63%) y un clon minoritario con deleciones de la secuencias del cromosoma 9 sobre el der(9) (96/300, 32%) además del componente normal (15/300, 5%) (figura 12).

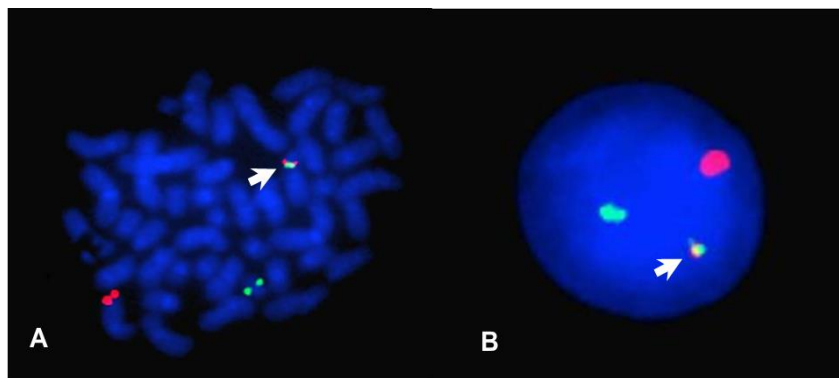


Figura 8. A-B) Metafase e Interfase con patrón de fusión *BCR/ABL1*. La ausencia de una segunda señal de fusión corresponde a una deleción del gen recíproco *ABL1/BCR* sobre el der(9) (1 fusión, 1 rojo, 1 verde). Las flechas blancas indican las señales de fusión.

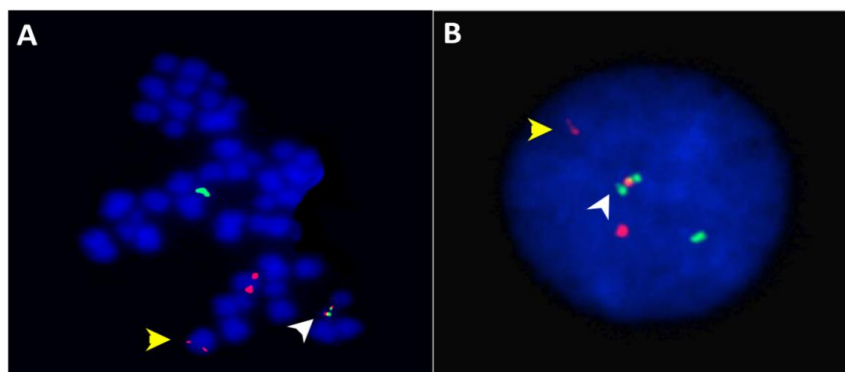


Figura 9. A-B: Metafase e Interfase con una fusión *BCR/ABL1*. La ausencia de una segunda señal de fusión corresponde a una deleción del gen recíproco *ABL1/BCR* sobre el der(9) que en este caso solo afecta a las secuencias del cromosoma 22 (1 fusión, 2 rojos, 1 verde). Las flechas blancas indican la señal de fusión y las flechas amarillas indican la señal roja del cromosoma der(9).

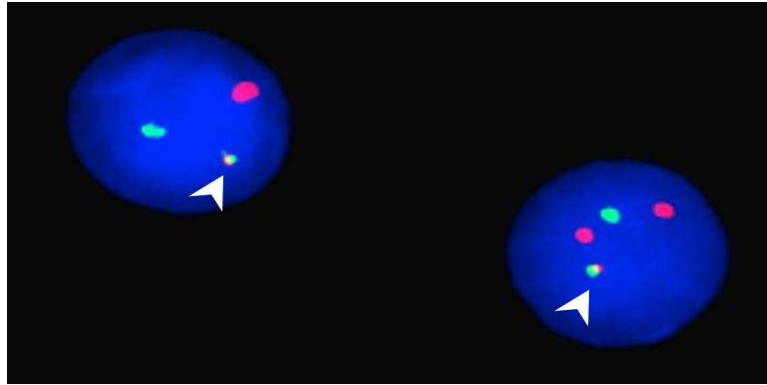


Figura 10. FISH interfásico mostrando dos clones diferentes en un mismo paciente. Izquierda, clon minoritario con un patrón de delección completo sobre el der(9). Derecha, clon mayoritario con delección de la secuencia del cromosoma 22 sobre el der(9) (1 fusión, 2 rojos, 1 verde). Las flechas blancas indican las fusiones.

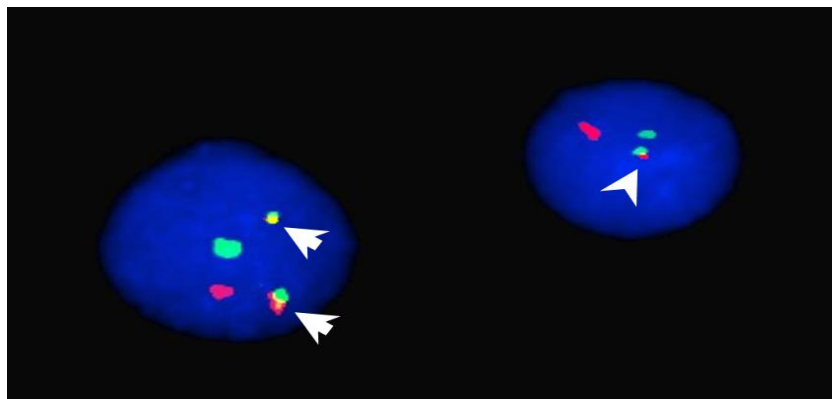


Figura 11. FISH interfásico mostrando dos clones diferentes en un mismo paciente. Izquierda, patrón clásico sin delecciones sobre el der(9). Derecha, clon minoritario con delección completa sobre el der(9). Las flechas blancas indican las fusiones.

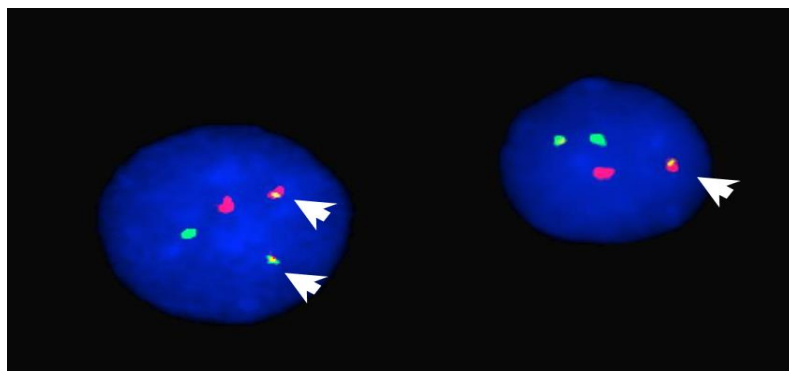


Figura 12. FISH interfásico mostrando dos clones diferentes en un mismo paciente. Izquierda, patrón clásico sin delecciones sobre el der(9). Derecha, clon minoritario con delección de la secuencia del cromosoma 9 sobre el der(9). Las flechas blancas indican las fusiones.

- Expresión transcripcional cualitativa de *BCR/ABL1* y *ABL1/BCR*

La expresión del transcrito *BCR/ABL1* fue determinada por RT-PCR en los 61 pacientes con LMC. El transcrito fue detectado en todos los casos, 41/61 pacientes presentaron la isoforma b3-a2 (67,3%) y 20/61 la isoforma b2-a2 (32,7%) (tabla1, figura 13). La expresión del transcrito recíproco *ABL1/BCR* fue detectada en 41 pacientes (67,2%), estando ausente en los 20 casos restantes (32,8%) (tabla1, figura 13).

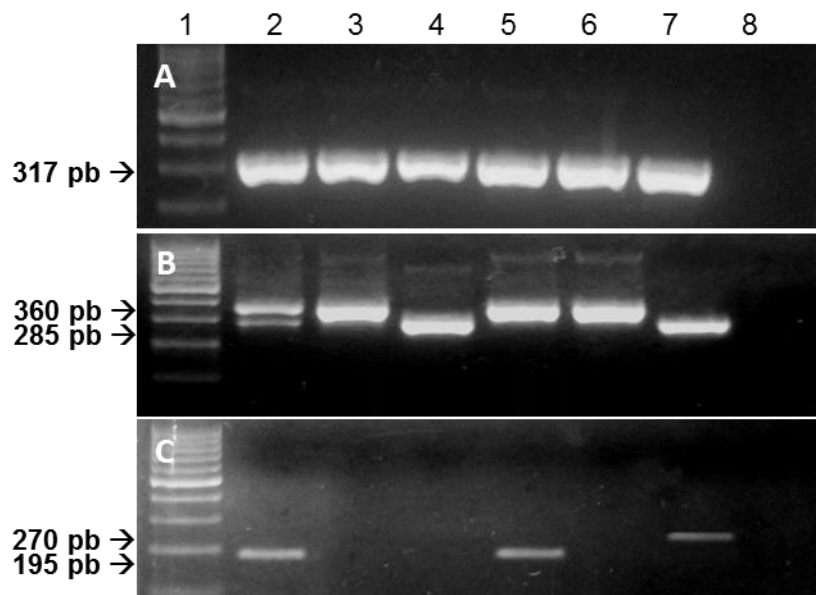


Figura 13. RT-PCR. A: β -Actina I (317pb) gen de expresión ubicua (*housekeeping gene*). B: *BCR/ABL1* (isoformas b3-a2: 360pb y b2-a2: 285pb). C: *ABL1/BCR* (isoformas 1b-b3: 270bp que constituye la contraparte de b2-a2 y 1b-b4: 195bp la contraparte de b3-a2). Calle 1: marcador de peso molecular. Calles 2 y 8: controles positivo y negativo respectivamente. Calles 3-7: muestras de pacientes con LMC.

- Comparación de parámetros clínicos, moleculares, respuesta hematológica, citogenética y molecular entre pacientes con y sin deleciones sobre el der(9).

El rol de las deleciones sobre el der(9) y su valor pronóstico es actualmente controversial. En etapas previas al uso de ITKs como tratamiento de primera línea, la presencia de deleciones sobre el der(9) era considerada un parámetro de mal pronóstico mostrando peor respuesta citogenética y molecular.

Si bien se desconoce el mecanismo por el cual las deleciones ejercen su efecto adverso, éstas parecen afectar genes supresores de tumor (GST) en la región delecionada mediante un mecanismo de haplo-insuficiencia.

- Comparación de características clínicas y expresión transcripcional cualitativa de *BCR/ABL1* y *ABL1/BCR*.

Las características clínicas y de laboratorio al diagnóstico son mostradas en la tabla 3 y fueron similares tanto en pacientes con y sin deleciones sobre el der(9). Los valores de mediana de esplenomegalia y de conteo leucocitario, fueron ligeramente superiores pero no significativos en pacientes con deleciones sobre el der(9) (test de Mann-Whitney, $p=0,09$ y $p=0,06$ respectivamente) (tabla 3).

Tabla 3. Características clínicas y de laboratorio de pacientes con y sin deleciones sobre el der(9).

Características (n=61)	Sin deleciones (n=47)	Con deleciones (n=14)	p
Sexo (M/F)	21/26 (0,8)	10/4 (2,5)	
Edad Promedio (rango)	45,3 (15 - 73)	45 (22 - 72)	
Esplenomegalia [cm]	4 (2,4 - 6)*	7 (4 - 12)*	0,09#
Conteo Leucocitario [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	75,5 (57 - 214)*	172,7 (84 - 261)*	0,06#
Conteo Plaquetario [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	301 (224 - 450)*	402 (262 - 450)*	0,59
Blastos en sangre periférica [%]	3 (2 - 5)*	3 (2 - 4)*	0,78
Hemoglobina (g/dL)	11,7 (10,6 - 12,9)*	11,05 (8,5 - 11,8)*	0,12
Índice de SOKAL			0,98
Pacientes evaluados	(n=46)	n=(13)	
Alto	10 (21,8)**	3 (23)**	
Intermedio	8 (17,3)**	2 (15,5)**	
Bajo	28 (60,9)**	8 (61,5)**	
Tratamiento	n=47	n=14	
Imatinib	32 (68,2)**	11 (78,5)**	
Nilotinib	5 (10,6)**	2 (14,2)**	
Dasatinib	10 (21,2)**	1 (7,14)**	
<i>BCR/ABL1</i>	n=47	n=14	
Isoforma b3-a2	32 (68)	9 (64,4)	0,9
Isoforma b2-a2	15 (32)	5 (35,6)	
<i>ABL1/BCR</i>	n=47	n=14	
Isoforma 1b-b4	28 (60)	2 (14,2)	
Isoforma 1b-b3	11 (23)		
Sin expresión	8 (17)	12 (85,8)	

* Mediana (Rango intercuartilo). ** n (%). # Se observa una tendencia a valores más elevados de leucocitos y tamaño de bazo en los casos con deleciones sobre el der(9).

Todos los casos de LMC expresaron alguna de las isoformas de *BCR/ABL1* (b2-a2, b3-a2). Cuando comparamos la frecuencia de estas variantes entre pacientes con y sin deleciones, no encontramos diferencias significativas (test exacto de Fisher, $p=0,9$) (tabla 3).

La expresión transcripcional del gen recíproco *ABL1/BCR* solo se detectó en dos de los 14 pacientes con deleciones sobre el der(9) (14,2%). Ambos casos presentaron coexistencia de clones. El primer caso con un clon mayoritario sin deleciones junto a un clon minoritario con un patrón de deleción completo y el segundo paciente con un clon mayoritario sin deleciones junto a un clon minoritario con deleciones de la secuencias del cromosoma 9.

La expresión de *ABL1/BCR* en el grupo de pacientes sin deleciones sobre el der(9) fue detectada en 39 de los 47 casos (83%), los que se distribuyeron en 28 pacientes con la isoforma 1b-b4 (60%) y 11 con la isoforma 1b-b3 (23%). Todas las isoformas encontradas se correspondieron con su contraparte transcripcional recíproca b3-a2 y b2-a2 respectivamente (tabla3)

Ocho pacientes (17%) sin deleciones sobre el der(9) no expresaron *ABL1/BCR*. De estos ocho, tres casos correspondían a pacientes con Ph variantes mientras los cinco restantes presentaban Ph clásico.

- qRT-PCR *BCR/ABL1* en pacientes con y sin deleciones al diagnóstico.

La presencia de deleciones sobre el der(9) pueden constituir un marcador indirecto de pequeñas deleciones sobre el cromosoma Ph que afectan regiones regulatorias del gen *BCR/ABL1* y por consiguiente sus niveles de expresión. La cuantificación relativa de los transcritos *BCR-ABL1* (p210) respecto del gen control *ABL1* entre pacientes con y sin deleciones se realizó utilizando el sistema comercial Molecular MD (*MolecularMD® One-Step qRT-PCR BCR-ABL kit*) (figura 14).

No se encontraron diferencias significativas en el nivel de transcritos de *BCR/ABL1* en pacientes con deleciones ($(BCR-ABL1/ABL1) \times 100 = 30,08\%$ (22,3 – 38,6) (mediana (IC 95%)) y sin deleciones 29,7% (22,8 – 36,3) (test de Mann-Whitney, $p=0,5$) (tabla 4).

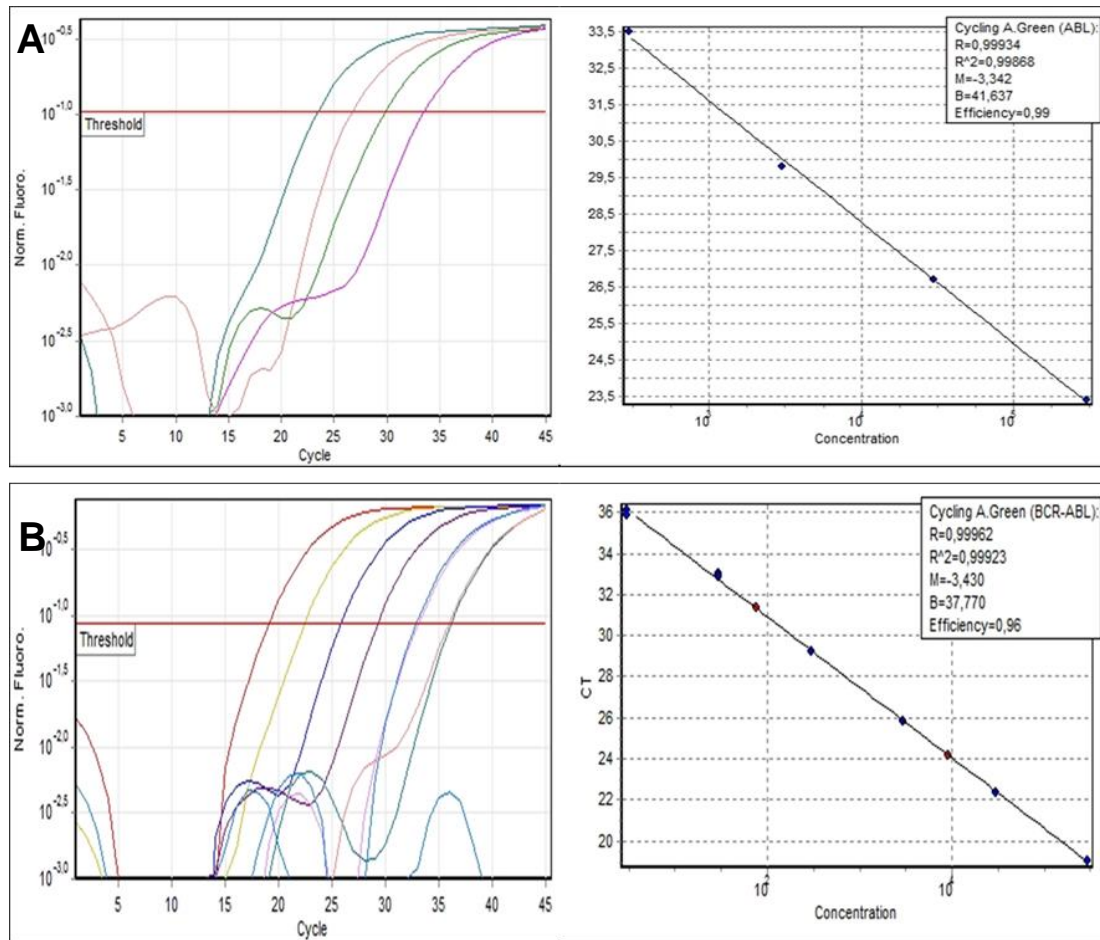


Figura 14. Curvas de amplificación de *ABL1* y *BCR/ABL1* escala logarítmica (izquierda). Pendiente de curva estándar usada para estimar la eficiencia de cada qPCR (derecha). El coeficiente de correlación (R^2) debe poseer un valor de 0,99 para ser adecuado. El resultado es una recta cuya pendiente teórica debe estar en un rango de -3,2 a -3,8 y una eficiencia de $1 \pm 10\%$. A: curva del gen control *ABL1*, plásmidos de 3×10^5 , 3×10^4 , 3×10^3 , 3×10^2 copias del gen *ABL1*. B: curva del gen *BCR/ABL1*^{p210}: plásmidos de 3×10^5 , 3×10^4 , 3×10^3 , 3×10^2 , 3×10^1 y 3×10^0 copias del gen de fusión *BCR/ABL1* (Kit Molecular MD)

Tabla 4. Expresión relativa cuantitativa de *BCR/ABL1* en pacientes con y sin deleciones sobre el der(9).

Con deleción (n=13) <i>BCR-ABL1/ABL1</i> x100	Sin deleción (n=44) <i>BCR-ABL1/ABL1</i> x100	p
30,08% (22,3 – 38,6) *	29,7% (22,8 – 36,3) *	0,5

*(%). Los valores de expresión de *BCR/ABL1* están expresados en escala internacional. El factor de conversión específico de nuestro laboratorio es 0,70.

- Análisis de los niveles de expresión de GSTs (*ASS1*, *PTGES* y *SMARCB1*).

Los genes *ASS1*, *PTGES* y *SMARCB1* son genes supresores de tumor que están ubicados en la región delecionada sobre el der(9). Una de las hipótesis más aceptadas actualmente es que la pérdida de actividad de uno de los alelos de estos genes (e.g., por deleciones) genera haploinsuficiencia y peor pronóstico. En consecuencia, se evaluaron las posibles diferencias de nivel de expresión de estos genes mediante qPCR - SYBRGreen (figura 15). Los niveles medios de expresión

(mediana) de los GST indicados fueron evaluados en controles sanos respecto de pacientes con LMC, y entre pacientes con LMC con y sin deleciones en el der(9).

- Gen *ASS1* (Arginina Succinato Sintetasa)

El nivel de expresión relativa de *ASS1* respecto del gen control B-Actina no mostró diferencias significativas entre los pacientes con LMC (n=61) 0,36 (0,23 - 0,50) (mediana (IC 95%)) y los controles (n=20) 0,17 (0,07 - 0,24) (test de Mann-Whitney, p=0,6) (figura 16A).

Por otro lado, la comparación de la expresión relativa de *ASS1* entre pacientes con y sin deleciones sobre el der(9), (n=14) 0,07 (0,04 – 0,1) y (n=47) 0,45 (0,3 – 0,62), respectivamente, mostró diferencias altamente significativas (test de Mann-Whitney, p=0,0001**) (figura 17 A). La expresión relativa de *ASS1* mostró una disminución de aproximadamente 6 veces en pacientes con deleciones sobre el der(9) respecto de los pacientes sin deleciones.

- Gen *PTGES* (Prostaglandina E Sintetasa)

El nivel de expresión relativa de *PTGES* mostró diferencias significativas entre los pacientes con LMC (n=60) 0,32 (0,22 - 0,42) y los controles (n=20) 0,12 (0,05 - 0,18) (test de Mann-Whitney, p=0,004*) (figura 16B). La expresión relativa de *PTGES* mostró un aumento de aproximadamente 2,6 veces en pacientes con LMC respecto de los controles.

A pesar de la diferencia de expresión de *PTGES* en pacientes con LMC, la expresión relativa entre casos con y sin deleciones sobre el der(9) (n=14) 0,32 (0,17 – 0,48) y (n=46) 0,31 (0,19 – 0,44) respectivamente, no mostró diferencias significativas (test de Mann-Whitney, p=0,18) (figura 17 B).

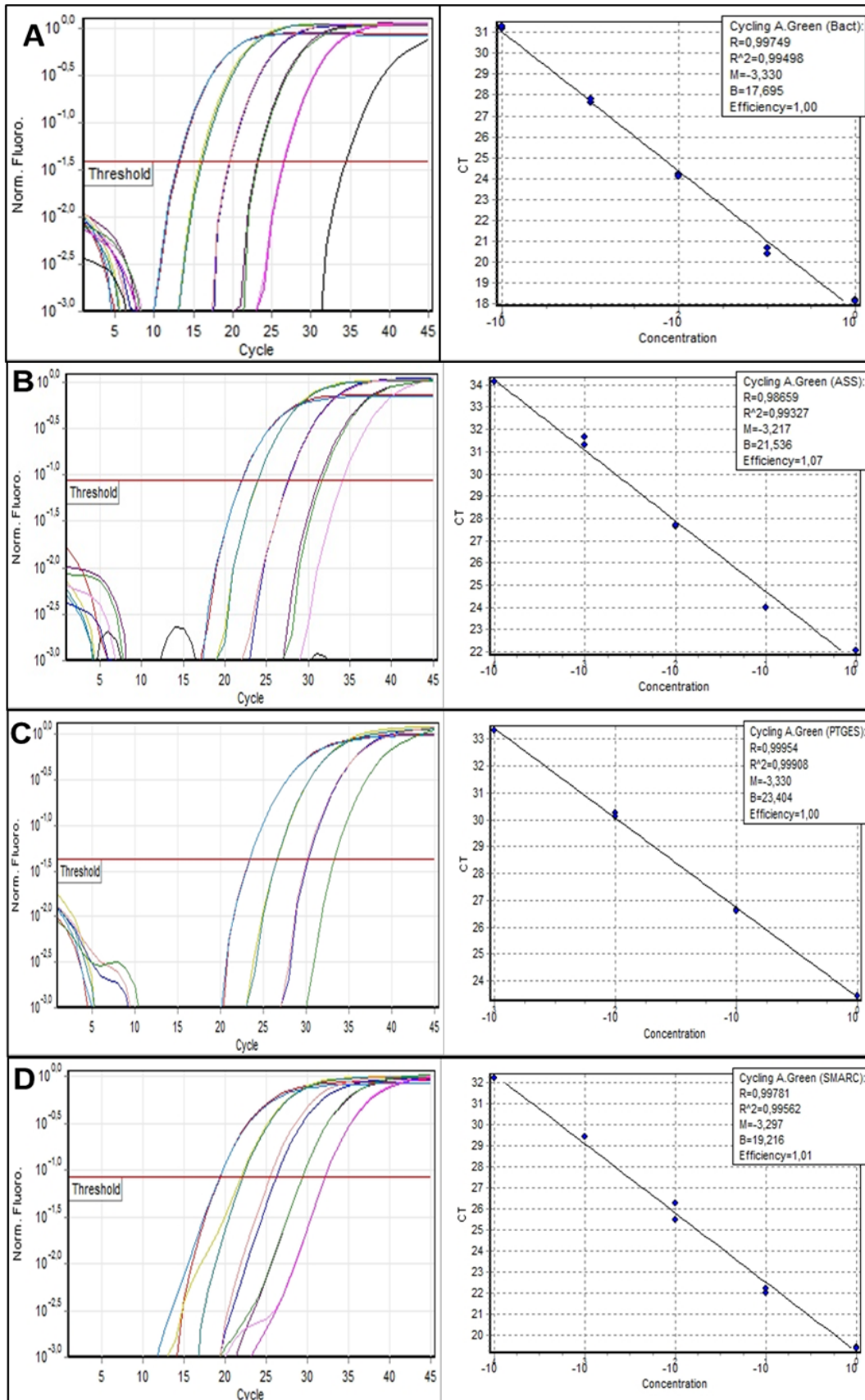


Figura 15. Curvas de amplificación obtenidas en línea K562 con SYBERGreen, en diluciones seriadas de 1.0 hasta 1/10.000 (escala logarítmica izquierda). Pendiente de curva estándar usada para estimar la eficiencia de cada qPCR (derecha). El coeficiente de correlación (R^2) debe poseer un valor de 0,99 para ser adecuado. El resultado es una recta cuya pendiente

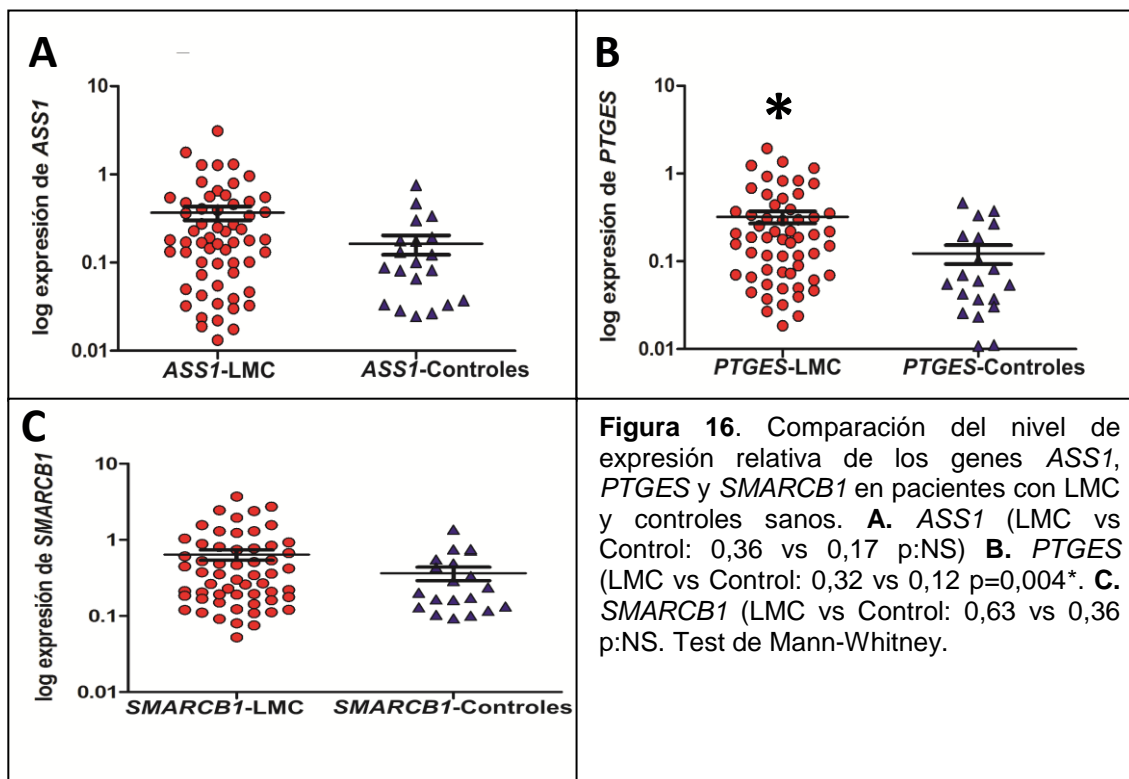
teórica debe estar en un rango de -3,2 a -3,8 y una eficiencia de $1 \pm 10\%$. (A) β -Actina I (housekeeping), (B) *ASS1*, (C) *PTGES* y (D) *SMARCB1*. Las curvas de calibración se realizaron

- Gen *SMARCB1* (Miembro 1, SWI/SNF Modificador de Cromatina Dependiente de Actina Asociado a Matriz de la Subfamilia B)

El nivel de expresión relativa de *SMARCB1* no mostró diferencias significativas entre pacientes con LMC (n=61) 0,63 (0,44 - 0,83) y los controles (n=20) 0,36 (0,21 - 0,51) (n=20) (test de Mann-Whitney, $p=0,17$) (figura 16 C).

La expresión relativa entre los pacientes con y sin deleciones sobre el der(9) (n=14) 0,35 (0,16 - 0,53) y (n=47) 0,72 (0,47 - 0,96) respectivamente, no mostró diferencias significativas (test de Mann-Whitney, $p=0,17$) (figura 17 C).

El análisis de expresión relativa de los GSTs cercanos al sitio de ruptura de la t(9;22) mostró que las deleciones sobre el der(9) solo afectaron los niveles de expresión del gen *ASS1* (figura 18).



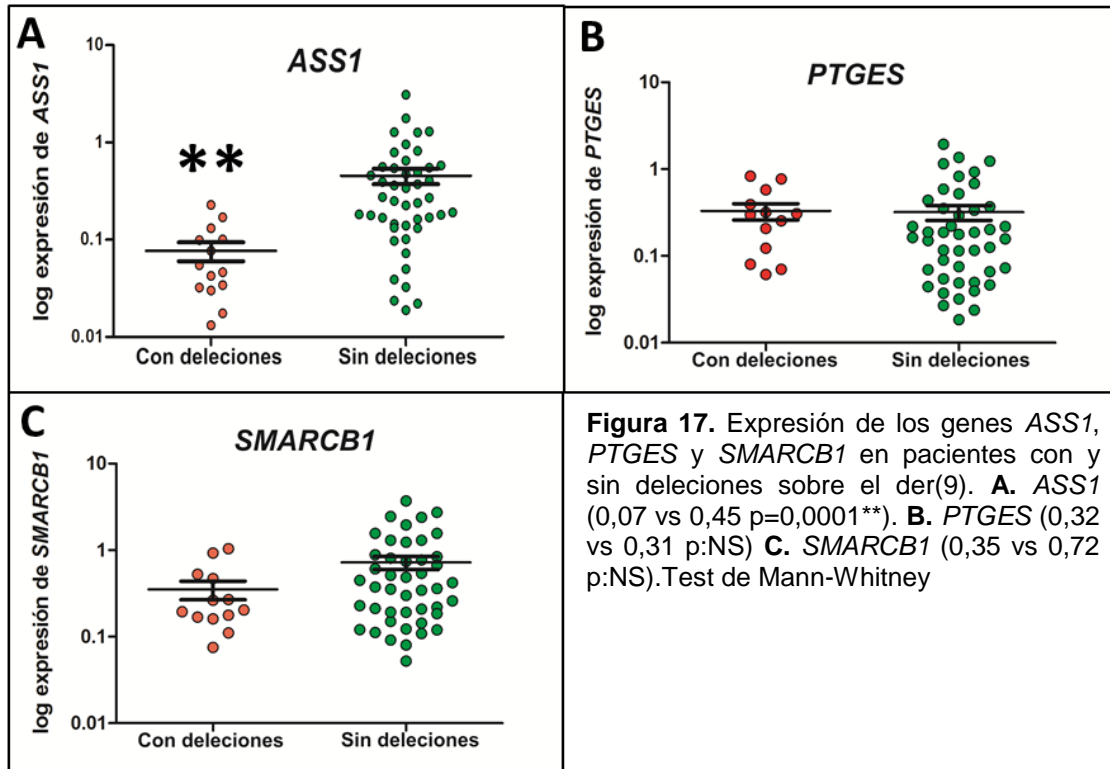


Figura 17. Expresión de los genes *ASS1*, *PTGES* y *SMARCB1* en pacientes con y sin deleciones sobre el der(9). **A.** *ASS1* (0,07 vs 0,45 p=0,0001**). **B.** *PTGES* (0,32 vs 0,31 p:NS) **C.** *SMARCB1* (0,35 vs 0,72 p:NS). Test de Mann-Whitney

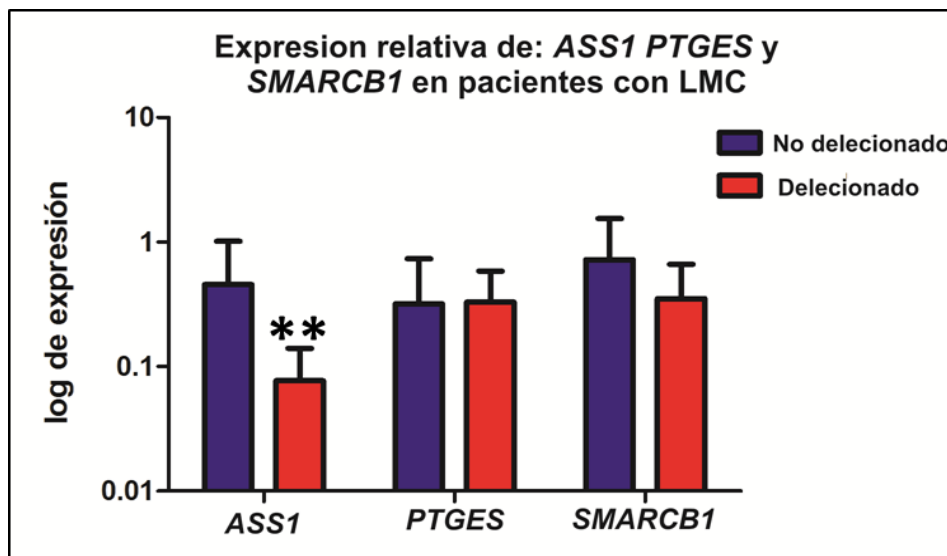


Figura 18. Perfiles de expresión de los genes *ASS1*, *PTGES* y *SMARCB1* en pacientes (LMC) con y sin deleciones sobre el der(9). **Diferencias significativas para *ASS1* (p=0,0001).

- Comparación de la respuesta hematológica, citogenética y molecular entre pacientes con y sin deleciones.

La respuesta hematológica, citogenética y molecular constituyen parámetros que permiten evaluar la respuesta al tratamiento en LMC.

Las definiciones y criterios de los grados de respuesta hematológica, citogenética y molecular fueron tomadas del Manual de LMC de la Sociedad Argentina de Hematología [Beligoy et al., 2015]. La respuesta hematológica completa (RHC) incluye la ausencia de síntomas de LMC, un recuento de glóbulos blancos (GB) $<10 \times 10^9/L$, basófilos $<5\%$, plaquetas $<450 \times 10^9/L$, ausencia de células inmaduras y blastos, promielocitos o metamielocitos en SP y ausencia de esplenomegalia. La respuesta hematológica parcial (RHP) involucra un recuento leucocitario normal y una disminución del 50% de la trombocitosis pero con esplenomegalia y células inmaduras persistentes y la respuesta hematológica nula (RHN) se refiere a la ausencia de mejora de cualquiera de los parámetros descriptos anteriormente.

En el caso de la respuesta citogenética, esta se clasifica en respuesta citogenética mayor (RCgMa), la que a su vez incluye a la respuesta citogenética completa (RCgC, 0% de células Ph+, en 20 metafases analizadas con bandeado G) y la respuesta citogenética parcial (RCgP, 1-35 % de células Ph+); la respuesta citogenética menor (RCgMen, 36-65% de células Ph+); respuesta citogenética mínima (RCgMin, 66-95% de células Ph+) y respuesta citogenética nula (RCgN, $>95\%$ de células Ph+).

La respuesta molecular en LMC ha sido estandarizada en cinco grupos: respuesta molecular nula (RMN), respuesta molecular mínima (RMMin), respuesta molecular menor (RMMe), respuesta molecular mayor (RMMa) y respuestas moleculares (RM) profundas con reducción de 4, 4,5 o 5 log respecto del valor basal ($RM^{4.0}$, $RM^{4.5}$, $RM^{5.0}$) para éstas últimas se requiere un número mínimo de copias del gen control *ABL1* (10.000, 32.000 y 100.000 respectivamente) para que tenga validez la cuantificación informada. (tabla 5) [Cross et al., 2012].

El término respuesta molecular completa (RMC), muy utilizado en un principio se ha reemplazado por RM de acuerdo al nivel de sensibilidad que se puede alcanzar en cada muestra

Las respuestas hematológica, citogenética y molecular fueron evaluadas y comparadas entre pacientes con y sin deleciones sobre el der(9), a los seis y 12 meses de iniciado el tratamiento con ITKs.

Tabla 5. Criterios de Respuesta Molecular

% BCR-ABL/ABL	Red. Log	Resp. Molecular	Copias gen ABL*
≤ 0,001% o indetectable	≥ 5.0 log	RM ^{5.0}	≥ 100.000
≤ 0,0032% o indetectable	≥ 4.5 log	RM ^{4.5}	≥ 32.000
≤ 0,01% o indetectable	≥ 4.0	RM ^{4.0}	≥ 10.000
0,01% - 0,1%	≥ 3	RM3.0 o RMMa	≥ 10.000
0,1% - 1%	≥ 2	RM2.0 o RMMe	
1% - 10%	≥ 1	RM1.0 o RMMín	
> 10%	< 1.0 log	RMNula	

En las Respuestas Moleculares RM 4.0, RM 4.5 y RM 5.0 se debe tener en cuenta el N° de copias del gen ABL para evitar falsos negativos [Cross, *et al*, 2012].

-Comparación de la respuesta hematológica.

El análisis de la respuesta hematológica respecto de la presencia o ausencia de deleciones sobre el der(9) se realizó teniendo en cuenta si los pacientes alcanzaron una RHC o menos que una RHC (incluyendo a la RHP y RHN). Este análisis no mostró diferencias significativas entre los casos con y sin deleciones sobre el der(9) a los seis y 12 meses de iniciado el tratamiento con ITKs (test exacto de Fisher, $p=0,23$ y $p=0,55$, respectivamente) (tabla 6).

El análisis de *odd ratio* (OR) mostró valores de 3,6 y 1,6 a los seis y 12 meses de tratamiento respectivamente. Aunque la serie analizada es pequeña, existe una tendencia, donde los pacientes con deleciones tiene tres veces menos probabilidad de alcanzar una RHC a los seis meses de tratamiento con ITKs. Esta tendencia disminuye, equiparando las posibilidades de alcanzar un RHC al año de tratamiento

Tabla 6. Respuesta hematológica en pacientes con y sin deleciones a los seis y 12 meses de tratamiento con ITKs.

	<RHC	RHC	OR (IC 95%)(n)
6 meses #			
Con deleciones	2	12	3,6 (0,46 - 28,8) (n=60)
Sin deleciones	2	44	
12 meses ##			
Con deleciones	1	13	1,6 (0,14 - 20) (n=60)
Sin deleciones	2	44	

Test exacto de Fisher: # $p=0,22$. ## $p=0,55$

- Comparación de la respuesta citogenética.

El análisis de respuesta citogenética (RCg) se realizó en función de los pacientes que alcanzaron una RCgMayor, la que incluye casos con RCgC y RCgP; y los pacientes que no alcanzaron dicha respuesta (<RCgMayor) que comprenden casos con RCgMen, RCgMin y RCgN. El análisis no mostró diferencias significativas entre los pacientes con y sin deleciones sobre el der(9) a los seis y 12 meses de iniciado el tratamiento con ITKs (test exacto de Fisher, $p=0,15$ y $p=0,68$, respectivamente) (tabla 7).

El análisis de *odd ratio* (OR) mostró valores de 2,6 y 1,5 a los seis y 12 meses de tratamiento respectivamente. Aunque la serie analizada es pequeña, la RCg también muestra una tendencia, donde los pacientes con deleciones tienen poco más del doble de posibilidades de no alcanzar una RCg Mayor a los seis meses de tratamiento con ITKs. Esta tendencia disminuye, equiparando las posibilidades de alcanzar un RCg Mayor al año de tratamiento con ITKs en ambos grupos de pacientes.

Tabla 7. Respuesta citogenética en pacientes con y sin deleciones a los seis y 12 meses de tratamiento con ITKs.

	<RCg Mayor	RCg Mayor	OR (IC 95%)(n)
6 meses #			
Con deleciones	5	9	2,6 (0,7 - 10) (n=60)
Sin deleciones	8	38	
12 meses ##			
Con deleciones	3	11	1,5 (0,3 - 6,8) (n=60)
Sin deleciones	7	39	

$p=0,15$. ## $p=0,68$

- Comparación de la respuesta Molecular

El análisis de la respuesta molecular (RM) se realizó en función de los pacientes que alcanzaron una respuesta molecular con una reducción ≥ 3 log en el nivel de expresión de *BCR/ABL1*, incluyendo los casos con $RM^{3,0}$, $RM^{4,0}$ y $RM^{4,5}$. Por otro lado se consideraron los pacientes con respuesta molecular < 3 log de reducción incluyendo los casos con RMMen, RMMin y RMN. El análisis no mostró diferencias significativas entre los pacientes con y sin deleciones sobre el der(9) a los seis y 12 meses de iniciado el tratamiento con ITKs (test exacto de Fisher, $p=0,26$ y $p=0,35$ respectivamente) (tabla 8).

El análisis de *odd ratio* (OR) mostró valores de 4,5 y 1,8 a los seis y 12 meses de tratamiento respectivamente. Aunque la serie analizada es pequeña, la RM, como en los casos anteriores, también muestra una tendencia, donde los pacientes con deleciones tienen 4,5 veces de probabilidades de no alcanzar una RMMayor (≥ 3 log de reducción) a los seis meses de tratamiento con ITKs. Esta tendencia disminuye a los 12 meses de tratamiento con ITKs en los casos con deleciones sobre el der(9).

Tabla 8. Respuesta molecular en pacientes con y sin deleciones a los seis y 12 meses de tratamiento con ITKs.

	RM<3 log	RM \geq 3 log	OR (IC 95%)(n)
6 meses #			
Con deleciones	13	1	4,5 (0,5 - 38) (n=60)
Sin deleciones	34	12	
12 meses ##			
Con deleciones	7	7	1,8 (0,5 - 6,2) (n=60)
Sin deleciones	16	30	

#p=0,26. ##p=0,35

- Análisis del reordenamiento *BCR/ABL1* a nivel genómico

Con el objetivo de caracterizar el rearrreglo molecular *BCR/ABL1* a nivel genómico se diseñó un esquema original basado en PCR-inversa de larga distancia (I-LD-PCR). Con este abordaje fuimos capaces de caracterizar el rearrreglo *BCR/ABL1* en seis pacientes con LMC, permitiendo el diseño de una reacción de amplificación PCR de alta sensibilidad para detección de enfermedad mínima residual caso-específica y caracterizar las secuencias de su recíproco *ABL1/BCR* en cinco de estos pacientes. El estudio combinado de las secuencias del reordenamiento directo y recíproco permitieron estimar los posibles mecanismos implicados en la translocación t(9;22)(q34;q11). Las secuencias obtenidas en estos seis pacientes han sido verificadas por alineación con el genoma de referencia actualizado (GRCh38.p7, último acceso el 07/09/2016).

Como resultado de I-LD-PCR, cada uno de los casos tuvo dos productos de amplificación. Una señal no rearrreglada correspondiente al fragmento del gen *BCR* de línea germinal (*BCR-LG*) de 4,3 kb, y una segunda señal, de tamaño variable, paciente específico correspondiente al rearrreglo *BCR/ABL1* (figura 19).

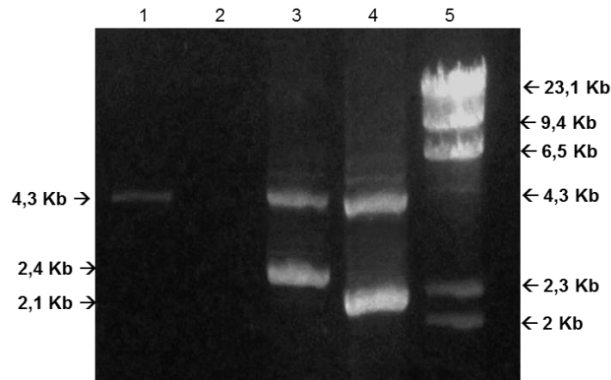


Figura 19. I-LD-PCR de pacientes con LMC. Calle 1: Control de señal *BCR*- LG. Calle 2: Control negativo. Calles 3 y 4: pacientes con LMC. Se observan dos señales en cada caso, una superior de 4,3 Kb correspondiente a la señal *BCR*- LG y una señal inferior 2,4 Kb y 2,1 Kb (calles 3 y 4, respectivamente) correspondientes al gen quimérico *BCR/ABL1*. Calle 5: Marcador de peso molecular *Lambda/HindIII*.

En cada caso, las señales fueron caracterizadas por secuenciación de Sanger obteniendo así las secuencias *BCR*-LG y *BCR/ABL1* paciente específico. Con estos datos se diseñaron un segundo conjunto de *primers*, caso específico para la amplificación por PCR convencional multiplex del punto de ruptura *BCR*-LG, *BCR/ABL1*, *ABL1/BCR* y *ABL1*-LG (figura 20).

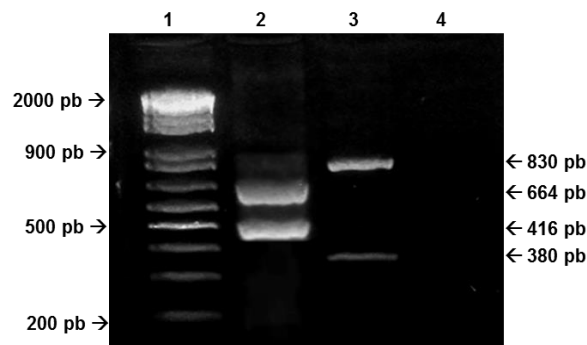


Figura 20. PCRs multiplex paciente específico de *BCR*-LG, *BCR/ABL1*, *ABL1*-LG y *ABL1/BCR*. Calle 1: Marcador de peso molecular. Calle 2: PCR multiplex paciente específico *BCR*-LG (664 pb) y *BCR/ABL1* (416 pb). Calles 3. PCR multiplex paciente específico *ABL1*-LG (830 pb) y *ABL1/BCR* (380 pb). Calle 4: Control negativo.

Estos productos PCR paciente-específico (PCR-PE) del rearrreglo *BCR/ABL1* directo y el recíproco *ABL1/BCR*, junto a los alelos de LG de *BCR* y *ABL1* fueron caracterizados por secuenciación de Sanger.

- Paciente #1

El punto de ruptura de *BCR* fue ubicado en el intrón 14 (NC_000022.11: 23291078), mientras el punto de ruptura de *ABL1* fue mapeado en el intrón 1a (NC_000009.12: 130738935) (figura 21).

El caso presentó una micro-homología de secuencia de 7 pb en *BCR-LG* y *ABL1-LG*, conservada en ambos genes quiméricos *BCR/ABL1* y *ABL1/BCR* (GCAGTGG, heptámero) (cursiva).

El gen *BCR/ABL1* presentó además una delección de 5 pb (GGGCT) separada por el dímero AG río arriba del heptámero común.

Caso #1	
	NC_000022.11: 23291078 ↓
<u>BCR-LG</u>	<u>AAAGATTAGCCGGGCTAGGCAGTGGGCACCTGTAATCACA</u>
<u>BCR/ABL1</u>	<u>AAAGATTAGCC</u> — <u>AG</u> <i>GCAGTGGT</i> GCGATCTCGATTCA
<u>ABL1/BCR</u>	<u>CCCAGGCTGCAGT</u> GCAAG <i>GCAGTGG</i> <u>GCACCTGTAATCACA</u>
<u>ABL1-LG</u>	<u>CCCAGGCTGCAGT</u> GCAAG <i>GCAGTGGT</i> GCGATCTCGATTCA
	NC_000009.12: 130738935 ↑

Figura 21. Paciente #1. Secuencias de *BCR-LG*, *BCR/ABL1*, *ABL1/BCR* y *ABL1-LG* obtenidas por secuenciación de productos de PCR-PE. Subrayado la secuencia de *BCR*, sin subrayar la secuencia de *ABL1* y en cursiva la secuencia homóloga (GCAGTGG) compartida en ambos genes quiméricos *BCR/ABL1* y *ABL1/BCR* (heptámero). La raya horizontal en *BCR/ABL1* marca la delección del pentámero GGGCT presente en *BCR-LG*. El recuadro muestra el trímero GCA duplicado en *ABL1/BCR*. El fondo gris indica el cambio G>C en la secuencia de *ABL1-LG* respecto de la secuencia de referencia en GenBank.

El gen *ABL1/BCR* mostró una duplicación del trímero GCA (recuadro) y la duplicación e inserción del dímero AG (de posible origen en *BCR*) antepuesto al heptámero común (GCAGTGG). Además la secuencia de *ABL1* mostró un cambio G>C (fondo gris) a 3 pares de bases río arriba del heptámero común en *ABL1*, indicando que el rearreglo molecular no fue estrictamente balanceado.

El análisis de motivos recombinogénicos cercanos a los sitios de ruptura de *BCR* y *ABL1* fueron investigados en un intervalo de 16 pb (tamaño arbitrario relacionado a la probabilidad de aparición de los motivos por azar) centrados en el punto de ruptura. Cercanos al punto de ruptura en *BCR* se encontraron siete motivos: dos *DNA polymerase α pause site core sequence 3* (GCS, donde S= G o C), y cinco

Vertebrate/plant topoisomerase I (RAT, CAT, CTY, donde Y= C o T; R= A o G). Asimismo, el punto de ruptura de *BCR* se ubicó sobre un elemento *AluSx1* de 299 pb. Cercanos a *ABL1* se encontraron dos motivos *DNA polymerase alpha pause site core sequence 3* (GCS, donde S= G o C) y el punto de ruptura se ubicó sobre un elemento *AluSx* de 303 pb.

- Paciente #2

El punto de ruptura de *BCR* fue ubicado en el intrón 13 (NC_000022.11: 23290091), mientras el punto de ruptura de *ABL1* fue mapeado en el intrón 1b (NC_000009.12: 130844285) (figura 22).

El caso presentó una micro-homología de secuencia de 5 pb (TGATG, pentámero) en *BCR-LG* y *ABL1-LG*, conservada en ambos genes quiméricos (cursiva). En *BCR-LG* el pentámero presenta además un cambio C>A (fondo gris) respecto a la secuencia de referencia en GenBank.

Caso #2	NC_000022.11: 23290091↓
<i>BCR-LG</i>	<u>TCACCCCGACCCCTCTGATGTCCTTGGAACCTTATTACA</u>
<i>BCR/ABL1</i>	<u>TCACCCCGACCCCTC</u> <i>TGATG</i> <u>TGAGAGATTGAGGAGGAAAAG</u>
<i>ABL1/BCR</i>	<u>ATGGAAAGGACAGAAG</u> <i>TGATG</i> <u>TTCCTTGGAACCTTATTACA</u>
<i>ABL1-LG</i>	<u>ATGGAAAGGACAGAAGTGATGAGAGATTGAGGAGGAAAAG</u>
	NC_000009.12: 130844285↑

Figura 22. Paciente #2. Secuencias de *BCR-LG*, *BCR/ABL1*, *ABL1/BCR* y *ABL1-LG* obtenidas de secuenciación de productos de PCR-PE. En cursiva se indica el pentámero (TGATG) presente en los genes quiméricos *BCR/ABL1* y *ABL1/BCR*. El fondo gris se indica el cambio C>A en *BCR-LG* respecto a la secuencia de referencia en GenBank.

En el intervalo de 16 pb sobre el sitio de ruptura en *BCR-LG* se encontraron siete motivos recombinogénicos: cinco *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites* (CAT, CTY, GTY, RAT, donde Y= C o T; y R= A o G), un *Ig heavy chain class switch repeat 3* (GGGGT) y un *Vaccinia topoisomerase I consensus* (YCCTT).

Asociados al sitio de ruptura de *ABL1* se encontraron, 13 motivos: siete *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites* (CAT, CTY, RAT), tres *DNA polymerase alpha pause site core sequence* (GAG), dos *Ig heavy chain class switch repeat 5* (TGAG) y un *Deletion hotspot consensus* (TGRRKM, donde K= G o T y

M= A o C). Además, el punto de ruptura se ubicó a 280 pb río arriba de un elemento *AluSq* de 262 pb.

- Paciente #3

El punto de ruptura de *BCR* fue ubicado en el intrón 14 (NC_000022.11: 23292030), mientras el punto de ruptura de *ABL1* fue mapeado en el intrón 1b (NC_000009.12: 130808202) (figura 23).

El caso presentó una micro-homología de secuencia de tres pb (TCC, trímero) en el punto de ruptura de *BCR-LG* y *ABL1-LG*, conservado en ambos genes quiméricos *BCR/ABL1* y *ABL1/BCR* (cursiva).

En *ABL1/BCR*, el dímero TA (de posible origen en *ABL1*) fue duplicado e insertado en el gen quimérico recíproco, consecutivo y río abajo del trímero común indicando que el rearrreglo molecular no fue estrictamente balanceado.

Caso #3	
	NC_000022.11: 23292030 ↓
BCR-LG	<u>GCCTCGCCTCCCTCCCTTCCCCCTGCACCCCACGACTTCT</u>
BCR/ABL1	<u>GCCTCGCCTCCCTCCCT</u> <i>TCCTAATTTCTTCTTCTTCTTCT</i>
ABL1/BCR	<u>TGCTGTGACAACCTTTA</u> <i>TCCTACCCTGCACCCCACGACTT</i>
ABL1-LG	TGCTGTGACAACCTTTATCCTAATTTCTTCTTCTTCTTCT
	NC_000009.12: 130808202 ↑

Figura 23. Paciente #3. Secuencias de *BCR-LG*, *BCR/ABL1*, *ABL1/BCR* y *ABL1-LG* obtenidas de secuenciación de productos de PCR-PE. El trímero TCC con identidad de secuencia en los alelos de LG se indica en cursiva en los genes quiméricos *BCR/ABL1* y *ABL1/BCR*.

Cercanos al punto de ruptura en *BCR-LG* se encontraron tres motivos recombinogénicos: un *Vaccinia topoisomerase I consensus* (YCCTT, Y= C o T), un *DNA polymerase alpha pause site core sequence I* (GAG), un *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites 2* (CTY).

En *ABL1* se encontraron siete motivos: seis *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites* (CTY, GTY, RAT) y un motivo *Murine parvovirus recombination hotspot* (CTWTTY, W= A o T). El punto de ruptura se ubicó sobre un elemento *AluSx* de 311 pb y 7 pb río abajo se encontró un micro satélite (TTC)₁₂.

- Paciente #4

El punto de ruptura de *BCR* fue ubicado en el intrón 13 (NC_000022.11: 23289730), mientras el punto de ruptura de *ABL1* fue mapeado en el intrón 1b (NC_000009.12: 130845710) (figura 24). El caso presentó una micro-homología de secuencia de 3 pb (TTT, trímero) en *BCR* y *ABL1* conservado en *BCR/ABL1* (cursiva).

El rearreglo *ABL1/BCR* por otro lado, mostró puntos de ruptura diferentes de los hallados en el rearreglo canónico *BCR/ABL1* (NC_000009.12: 130845787 y NC_000022.11: 23289512). Estos sitios de ruptura diferentes, fueron consecuencia de una duplicación bidireccional de 295 pb sobre *ABL1/BCR* (77 pb de *ABL1* y 218 pb de *BCR*) (figura 25). La presencia de esta duplicación parece afectar la transcripción del gen quimérico recíproco al modificar la secuencia del sitio aceptor de *splicing* del exón 13 en *BCR*, que de esta forma suprimió la expresión de *ABL1/BCR*.

CASO #4	
	NC_000022.11: 23289730 ↓
<u>BCR-LG</u>	<u>TGATGGGACTAGTGGACTTTGGTTCAGAAGGAAGAGCTAT</u>
<u>BCR/ABL1</u>	<u>TGATGGGACTAGTGGAC</u> <i>TTTAAGGCATTAATAAGAGCTAT</i>
<u>ABL1/BCR</u>	<u>AAAAAGTCTTTTGAGGACCCAGGTTTCAGAAGCTTCTCC</u>
<u>ABL1-LG</u>	<u>GAATAAAGAGACAGTTATTTAAGGCATTAATAAGAGCTAT</u>
	NC_000009.12:130845710 ↑

Figura 24. Paciente #4. Secuencias de *BCR-LG*, *BCR/ABL1*, *ABL1/BCR* y *ABL1-LG* obtenidas de secuenciación de productos PE. El trímero TTT con identidad de secuencia en los alelos de LG se indica en cursiva en el gen quimérico *BCR/ABL1*.

Se encontraron tres motivos recombinogénicos *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites* (CTY, GTY; Y= C o T) asociados al punto de ruptura en *BCR*.

Cercanos al sitio en *ABL1* se encontraron seis motivos, todos del tipo *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites* (CAT, CTY, GTY, RAT). Asimismo, el punto de ruptura se encontró sobre un elemento *DNA/hAT-Charlie* de 182 pb.

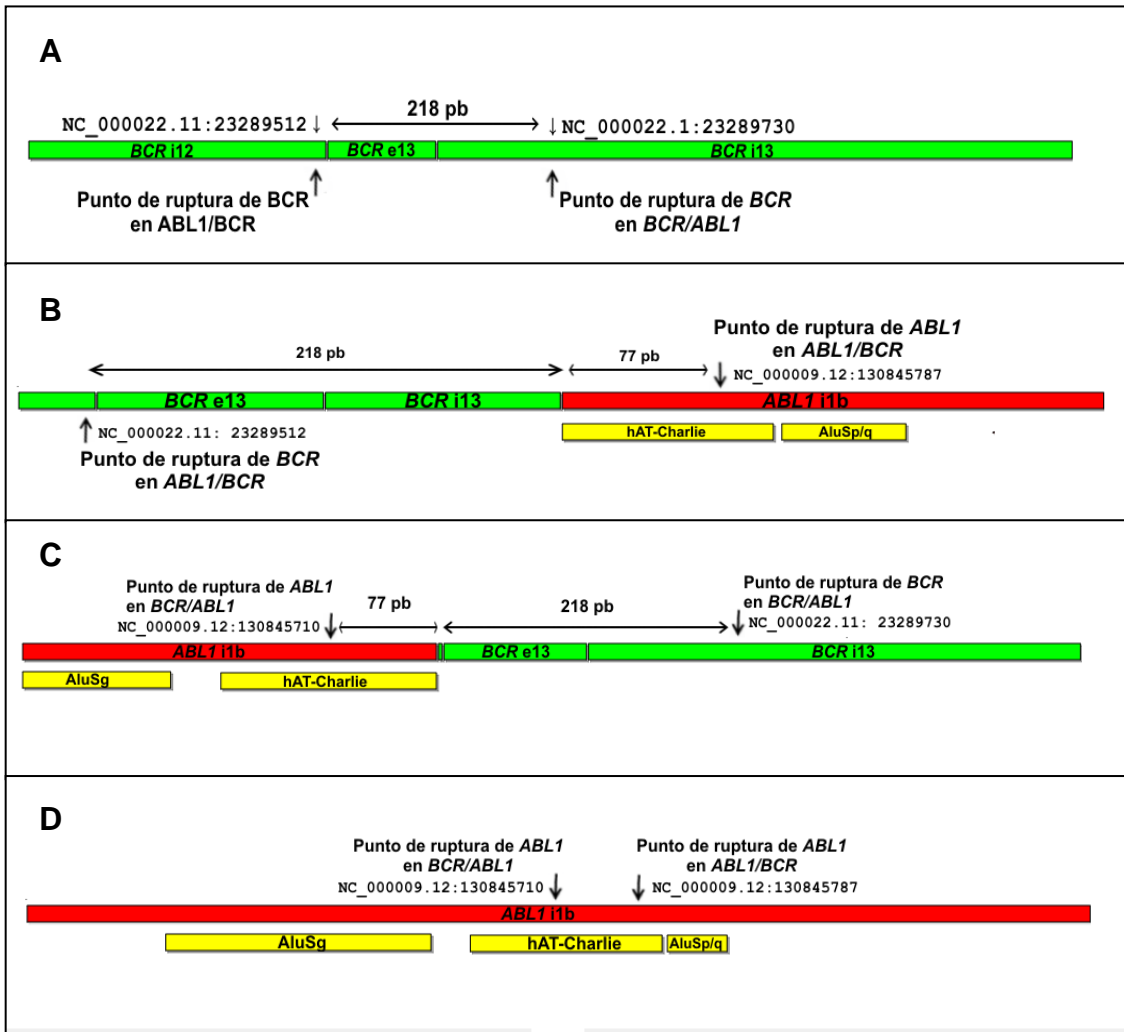


Figura 25. Representación esquemática de *BCR* (A), *BCR/ABL1* (B), *ABL1/BCR* (C) y *ABL1* (D) del paciente #4, donde se indican los diferentes puntos de ruptura encontrados en *BCR* y *ABL1* para ambos genes quiméricos, consecuencia de una duplicación bidireccional de 295 pb en *ABL1/BCR* (77 pb de *ABL1* y 218 pb de *BCR*). Rojo: intrón 1b de *ABL1*. Verde: exón 13 e intrón 13 de *BCR*. Amarillo: elementos Alu y hAT-Charlie cercanos al punto de ruptura en *ABL1*.

-Paciente #5

El punto de ruptura de *BCR* fue ubicado en el intrón 13 de gen (NC_000022.11: 23289931), mientras el punto de ruptura de *ABL1* fue mapeado en el intrón 1a (NC_000009.12: 130832320) (figura 26).

No se encontró micro-homología de secuencia, deleciones, inserciones o duplicaciones en el gen quimérico *BCR/ABL1*.

El gen quimérico recíproco *ABL1/BCR* presentó la duplicación del tetrámero TTCA (paréntesis) sobre su parte *ABL1* y la delección del dímero AG sobre su secuencia *BCR* (punteado).

CASO #5	
	NC_000022.11: 23289931 ↓
<u>BCR-LG</u>	<u>GGCCCCACTCCCGTCCTCCCAGCCCTCCTCTCCTCCAGCT</u>
<u>BCR/ABL1</u>	<u>GGCCCCACTCCCGTCCTCCCACCATCTCAAAAAAAAAAAA</u>
<u>ABL1/BCR</u>	<u>TTTTAGTAGAGATGGGGTTT (TTCA) --CCCTCCTCCTCCT</u>
<u>ABL1-LG</u>	<u>TTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACCATCTCAAAAAAAAAAAA</u>
	NC_000009.12: 130832320 ↑

Figura 26. Paciente #5. Secuencias de *BCR-LG*, *BCR/ABL1*, *ABL1/BCR* y *ABL1-LG* obtenidas de secuenciación de productos de PCR específicos del paciente.

BCR mostró la presencia de tres motivos recombinogénicos cercanos al sitio de ruptura: dos *DNA polymerase alpha pause site core sequence* (GAG, GCS; donde S= G o C) y un *Translin-binding site 2* (GCCWSSW, donde W= A o T). Cercanos al sitio de ruptura de *ABL1*, se encontraron seis motivos: cinco *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites* (CAT, CTY, GTY, RAT, donde Y= C o T y R= A o G), y un *DNA polymerase alpha/betha frameshift hotspot 1* (ACCCCA). Además, el punto de ruptura de *ABL1* se ubicó sobre un elemento *AluSg/x* de 201 pb.

- Paciente #6

El punto de ruptura de *BCR* fue ubicado en el intrón 13 de gen (NC_000022.11: 23289904), mientras el punto de ruptura de *ABL1* fue mapeado en el intrón 1b (NC_000009.12: 130850793) (figura 27). El caso presenta un trímero GCC sobre el punto de ruptura con micro-homología de secuencia en los alelos *BCR-LG* y *ABL1-LG* conservado en *BCR/ABL1* (cursiva). El gen quimérico *BCR/ABL1*, presentó sobre su parte *ABL1* una inversión de 73 pb.

La secuencia de *ABL1/BCR* no pudo ser determinada por nuestra metodología, por lo que se sospechó la presencia de una gran delección sobre el der(9), la que fue confirmada por FISH y la ausencia de expresión de *ABL1/BCR*.

CASO #6	NC_000022.11:23289904↓
<u>BCR-LG</u>	<u>TCCTCAGATGCTCTGTGCCTTGGATCTGGCCCCACTCCCG</u>
<u>BCR/ABL1</u>	<u>TCCTCAGATGCTCTGT</u> <i>GCCTAAACAAACAAACAAAAACAA</i>
<u>ABL1/BCR</u>	AMPLIFICACIÓN (-) (GRAN DELECIÓN)
<u>ABL1-LG</u>	TGGGATAACAGGCATGAGCCACCGCACCCAGCCCCACATA
	NC_000009.12:130850793↑

Figura 27. Paciente #6. Secuencias de *BCR-LG*, *BCR/ABL1* y *ABL1-LG* obtenidas de secuenciación de productos de PCR-PE. Las secuencias en cursiva corresponden al triplete (GCC) con identidad de secuencia en los alelos de LG de *BCR* y *ABL1*.

Cercanos a *BCR* se encontraron dos motivos recombinogénicos: un *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites* (CTY; donde Y= C o T) y un *Deletion hotspot consensus* (TGRRK M, donde R= A o G; K= G o T; M= A o C).

Cercanos al sitio de ruptura en *ABL1*, se encontraron ocho motivos: tres *DNA polymerase alpha pause site core sequence* (GAG, GCS, donde S= G o C), cuatro *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites* (CAT, CTY), un *Ig heavy chain class switch repeat 5* (TGAG). Además el punto de ruptura se ubicó sobre un elemento *AluSx* de 301 pb.

Evaluación de enfermedad mínima residual. Análisis *BCR/ABL1* genómico paciente específico vs. qRT-PCR transcripcional.

En LMC, la evaluación de enfermedad mínima residual (EMR) se realiza mediante el empleo de qRT-PCR, que evalúa la reducción del nivel de transcritos *BCR/ABL1*.

El uso de una PCR-PE sobre ADN genómico constituye un examen complementario informativo, en particular en respuestas moleculares profundas (i.e., >3 log de reducción). Por ello, evaluamos en paralelo nuestra metodología de PCR-PE *BCR/ABL1* y las qRT-PCR en cuatro de los pacientes caracterizados (se disponían de muestras pareadas de ARN total y de ADNg de leucocitos de SP) durante la evaluación del tratamiento (figuras 28 - 32).

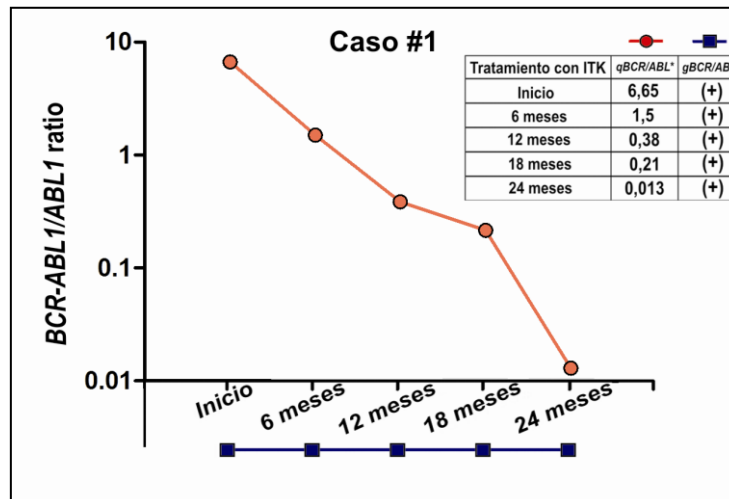


Figura 28. Gráfica del análisis conjunto de los niveles de transcripto *BCR/ABL1* (qRT-PCR) y la presencia del clon *BCR/ABL1* PE (paciente #1). La mejor respuesta alcanzada fue una RMMa (0,013 %; 3 log de reducción) a los 24 meses de tratamiento con ITKS (puntos rojos). La PCR-PE detectó la presencia del clon neoplásico durante todo el seguimiento.

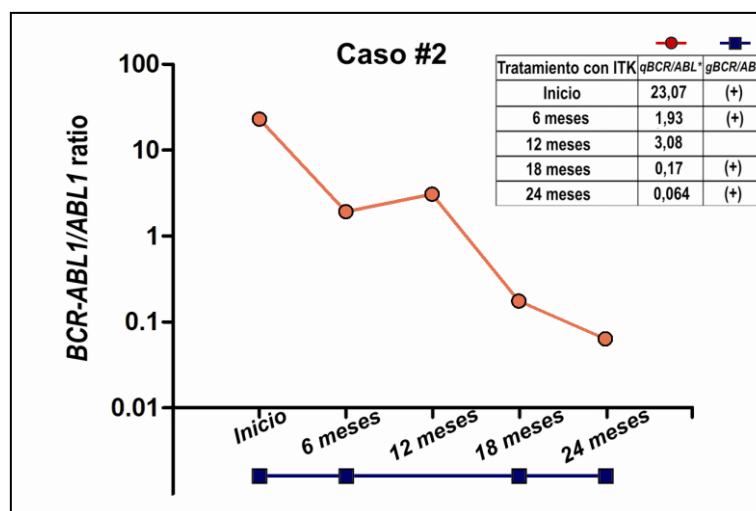


Figura 29. Gráfica del análisis conjunto de los niveles de transcripto *BCR/ABL1* (qRT-PCR) y la presencia del clon *BCR/ABL1* PE (paciente #2). La mejor respuesta alcanzada fue una RMMa (0,064 %, 3 log de reducción) a los 24 meses de tratamiento con ITKS (puntos rojos). La PCR-PE detectó la presencia del clon neoplásico durante todo el seguimiento excepto en el control de 12 meses de tratamiento donde no se contó con la muestra de ADNg.

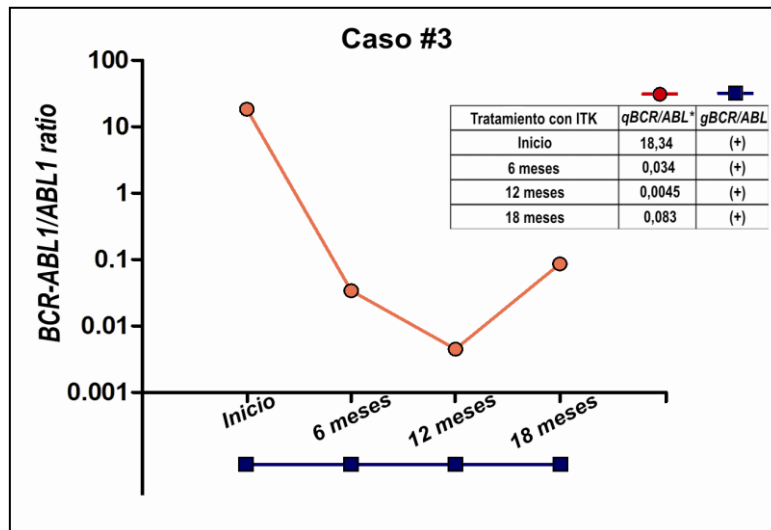


Figura 30. Gráfica del análisis conjunto de los niveles de transcripto *BCR/ABL1* (qRT-PCR) y la presencia del clon *BCR/ABL1* PE (paciente #3). La mejor respuesta alcanzada fue una RM 4.0 (0,0045%, > 3 log de reducción) a los 12 meses de tratamiento (puntos rojos). La PCR PE detectó la presencia del clon neoplásico durante todo el seguimiento.

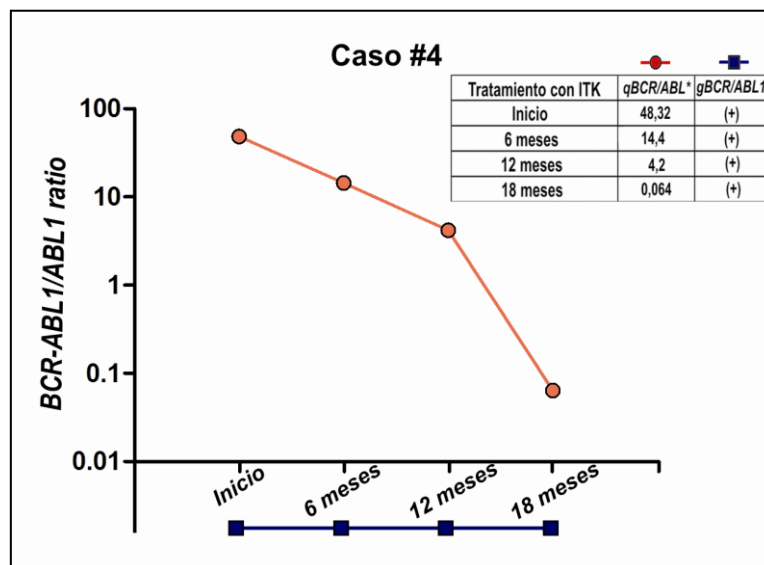


Figura 31. Gráfica del análisis conjunto de los niveles de transcripto *BCR/ABL1* (qRT-PCR) y la presencia del clon *BCR/ABL1* PE (paciente #4). La mejor respuesta alcanzada fue una RMMa (0,064%, 3 log de reducción) a los 12 meses de tratamiento con ITKS (puntos rojos). La PCR-PE detectó la presencia del clon neoplásico durante todo el seguimiento.

El rearreglo *BCR/ABL1* genómico fue detectado en todas en las muestras de seguimiento. Sin embargo, dado que ninguno de los casos logró respuestas aún más profundas (e.g., RM 4.5 o 5.0) no pudimos evaluar la sensibilidad de nuestra metodología con niveles de expresión menores.

Discusión

- Aspectos epidemiológicos, citogenéticos y moleculares en LMC.

La LMC es un desorden clonal de médula ósea de células madre hematopoyéticas. Tiene una incidencia de 1 a 2 nuevos casos por cada 100.000 habitantes por año y se cuenta entre el 15 – 20% de todos los casos de leucemia en adultos [Faderl *et al.*, 1999; Heim & Mitelman, 2009].

La LMC es una enfermedad más frecuente en personas adultas mayores, aunque no excluyentemente, con una de edad promedio de 65 años y una ligera preponderancia de pacientes masculinos [Heim & Mitelman, 2009; Zhang & Rowley, 2011; Höglund *et al.*, 2015].

El promedio de edad hallado en nuestra población (45,2 años) se encuentra muy por debajo del promedio de edad general descripto para la LMC. Un estudio epidemiológico reciente, donde se comparan los edades promedio de los pacientes al momento del diagnóstico, dividiendo los resultados por regiones (Asia, Europa, América Latina y África), y éstas a su vez en sub-regiones arrojó un valor promedio de edad de 41,3 años para América del Sur, valor muy cercano al hallado en nuestro análisis, reflejando que las diferencias de edad de diagnóstico encontradas se deben a diferencias étnicas – geográficas [Mendizabal *et al.*, 2013].

El resto de las características epidemiológicas (relación de sexos) y clínicas analizadas (i.e., esplenomegalia, conteo leucocitario, conteo plaquetario, porcentaje de blastos, hemoglobina) en nuestra serie de pacientes, no mostró diferencias con los datos generales internacionales descriptos para la LMC [Heim & Mitelman, 2009; Zhang & Rowley, 2011; Höglund *et al.*, 2015].

Alrededor del 85% - 95% de los pacientes con LMC al momento del diagnóstico exhiben el cromosoma Ph como alteración citogenética característica. El 5 - 15% restante presentan translocaciones variantes (Ph variantes) que pueden involucrar a uno o más cromosomas del complemento además de los cromosomas 9 y 22 [Heim & Mitelman, 2009; Zhang & Rowley, 2011]. Un pequeño porcentaje (<5%) de los casos de LMC al diagnóstico, presentan además del cromosoma Ph, alteraciones cromosómicas adicionales (ACAs) [Luatti *et al.*, 2012]. Estas aberraciones se han descripto como un factor pronóstico independiente con un impacto negativo en la

respuesta citogenética y molecular cuando se tratan de alteraciones de la “ruta mayor” [Fabarius *et al.*, 2015].

En nuestra población, la frecuencia de Ph estándar alcanzó el 93,5% en concordancia con la literatura [Heim & Mitelman, 2009, Zhang & Rowley, 2011]. La frecuencia de casos con ACAs al diagnóstico hallados en nuestra serie de pacientes (3,2%, n= 2) concuerda con lo descrito en LMC. Dentro de estos dos pacientes encontramos un caso de la “ruta mayor” con trisomía del cromosoma 8 y otro con una translocación balanceada $t(13;14)(q12;q31)$ no descrita previamente en LMC [Fabarius *et al.*, 2011; 2015, Mitelman *et al.*, 2016]. Ninguno de nuestros casos con ACAs presentó deleciones o falta de respuesta a tratamiento con ITKs, a pesar de la evidencia publicada acerca del valor pronóstico negativo de estos hallazgos [Fabarius *et al.*, 2011; 2015].

Basados en el análisis citogenético los Ph variantes han sido clasificados en dos subgrupos: Ph variante simple, donde el cromosoma 22 es translocado a un cromosoma diferente del 9, $t(22;V)$, y los Ph variante compleja, donde los cromosomas 9 y 22 están involucrados en rearrreglos con uno o más cromosomas adicionales, $t(9;22;V)$ [Naumann & Decker, 2003].

La frecuencia de Ph variantes en nuestra población alcanzó el 6,5% y todos los casos fueron variantes complejas que incluyeron cromosomas y puntos de ruptura ya descritos en la literatura: $t(2;9;22)(p23;q34;q11)$, $t(9;21;22)(q34;p11;q11)$, $t(4;9;22)(p14;q34;q11)$ y $t(8;9;22)(q13;q34;q11)$ [Gorusu *et al.*, 2007; Richerbourg *et al.*, 2008; Luatti *et al.*, 2012; Mitelman *et al.*, 2016]. En épocas previas al uso de los ITKs como tratamiento de primera línea, la presencia de Ph variantes era controversial respecto de su valor pronóstico, en particular en función de su mecanismo de formación.

Se han propuesto dos vías diferentes para explicar la génesis de los Ph variantes: (1) un mecanismo en una etapa y (2) en dos etapas. El primero corresponde a un suceso único de rearrreglos donde ocurren tres roturas simultáneas en 3 cromosomas diferentes, seguidas de la reunión recíproca de los segmentos implicados. En el caso (2), en primer lugar sucede la translocación clásica $t(9;22)$, seguida de un segundo evento de translocación con un tercer cromosoma. Este mecanismo sugiere que la formación de un Ph variante, es en esencia evolución

clonal, ya que la segunda translocación constituye una alteración citogenética adicional [Richerbourg *et al.*, 2008].

Con el uso de FISH pudimos estimar que el mecanismo de formación de los Ph variantes en los 4 casos fue en una etapa (1). Este tipo de rearrreglo no conferiría ningún impacto en el fenotipo o en el pronóstico de la patología, respecto de pacientes con el cromosoma Ph estándar [Richerbourg *et al.*, 2008]. En la actualidad, se considera que la presencia de Ph variante, independientemente del mecanismo de formación, no tiene impacto pronóstico en la respuesta al tratamiento con ITKs [Baccarani *et al.*, 2013, Beligoy *et al.*, 2015].

Por otra parte, el transcripto *BCR/ABL1* presenta principalmente dos isoformas en LMC, b2-a2 y b3-a2. En nuestra población se observó una frecuencia superior de la isoforma b3-a2 (67,3%), la que coincide con publicaciones previas [Branford, *et al.*, 2000; Bennour *et al.*, 2013]. Sin embargo, algunos estudios han encontrado que la isoforma b2-a2 es más común entre poblaciones de México y Sudán; estas diferencias de frecuencia han sido relacionadas a la distribución geográfica y étnica de los pacientes [Paz y Mino *et al.*, 2000; Osman *et al.*, 2010].

No se han identificado diferencias significativas entre la presencia de alguna de las isoformas (b2-a2 o b3-a2) y relación de sexos, edad y respuesta a tratamiento [Heim & Mitelman, 2009; Bennour, *et al.*, 2013].

- Deleciones sobre el der(9)

Las deleciones sobre el der(9) analizadas por FISH se presentan en un 10-20% de los pacientes con LMC [Huntly *et al.*, 2003; Bennour *et al.*, 2013]. Anteriormente al uso de los ITKs como terapia de primera línea, la identificación del estatus delecionado/no delecionado constituía un factor pronóstico independiente, que varios autores consideraban más importante, incluso, que el índice de Sokal [Sokal *et al.*, 1984] o el índice de Hasford [Hasford *et al.*, 1998] [Huntly *et al.*, 2003, Gorusu *et al.*, 2007].

La frecuencia de deleciones en nuestra población se observó en el 30% (n= 14/61) de los casos. Las mismas fueron de tamaño variable, tratándose en su mayoría (71%) de deleciones >1 Mb, que abarcaban tanto secuencias del cromosoma 9 como

del 22 (deleciones completas) y, en menor proporción deleciones que afectaban o, sólo secuencias del cromosoma 22 (21%), o sólo secuencias del cromosoma 9 (7%) [Zagaria *et al.*, 2006; Vaz de Campos *et al.*, 2007; De Melo *et al.*, 2008; Bennour *et al.*, 2012].

Reportes previos indican que las deleciones de material genético sobre el der(9) tienen lugar y ocurren en forma simultánea con la translocación t(9;22)(q34;q11). [Sinclair *et al.*, 2000; Kolomietz *et al.*, 2001; Huntly *et al.*, 2001; 2003; Fourouclas *et al.*, 2006; Heim & Mitelman, 2009; Castagnetti, *et al.*, 2010; Bennour *et al.*, 2012].

Nuestros resultados, mostraron que tres de los 14 casos (21%) con deleciones sobre el der(9), tenían la presencia de al menos dos clones patológicos. El primer caso presentó un clon con deleciones de las secuencias del cromosoma 22 y un clon con deleción completa sobre el der(9). El segundo presentó un clon sin deleciones y otro con deleción completa sobre el der(9). El tercero presentó un clon sin deleciones y otro con deleciones de la secuencias del cromosoma 9. La coexistencia de dos clones en estos tres pacientes sólo puede explicarse si las deleciones sobre el der(9) son posteriores a la translocación t(9;22)(q34;q11). La evidencia hallada en nuestro análisis indica, que al menos en una pequeña proporción de casos (21%), la deleción sobre el der(9) puede darse como un evento posterior a la translocación indicando evolución clonal.

Algunos estudios de pacientes con LMC reportan hallazgos similares al nuestro y sostienen que la coexistencia de clones con y sin deleciones sobre el der(9) indicarían que éstas pueden ser un evento secundario temprano o incluso que pueden adquirirse durante la evolución de la enfermedad [Grand, *et al.*, 1999; Rudduck-Sivaswaren *et al.*, 2005; Xinh *et al.*, 2006].

Las deleciones sobre el der(9) incluyen el punto de ruptura de la translocación y abarcan un tamaño variable sobre secuencias de *ABL1* y de *BCR*, por lo tanto cabe esperar la ausencia de expresión de *ABL1/BCR*, gen quimérico recíproco formado durante la translocación [Huntly *et al.*, 2001; 2003].

Entre los 14 casos con un patrón de deleción sobre el der(9), 12 no presentaron expresión de *ABL1/BCR* como se esperaría. En los dos casos restantes se detectó expresión del gen recíproco, esta inconsistencia se explica por la

coexistencia de dos clones identificados, uno de ellos sin deleciones sobre el der(9) conservando el gen quimérico *ABL1/BCR* intacto. La expresión positiva de *ABL1/BCR* en estos pacientes con múltiples clones, es evidencia adicional que apoya la idea de que al menos en un pequeño porcentaje de casos, las deleciones sobre el der(9) pueden ser un evento secundario temprano o incluso que éstas pueden darse como un proceso posterior durante la evolución de la enfermedad [Xinh *et al.*, 2006; Gorusu *et al.*, 2007]. Desde una perspectiva general, la coexistencia de múltiples clones ha sido encontrada y documentada en diferentes leucemias [Heim & Mitelman, 2009]. En este escenario, la presencia de nuestros casos asociados a la coexistencia de clones con y sin deleciones en el der(9) pueden ser considerados un reflejo más de este fenómeno.

En contraste, 47 casos de nuestro análisis no presentaron deleciones apreciables sobre el der(9), sin embargo sólo 39 de ellos (83%) mostraron expresión de *ABL1/BCR*. La frecuencia total de casos expresando el gen quimérico recíproco es similar a la reportada previamente por otros autores [Melo, *et al.*, 1993; 1994; 1996; De la Fuente, *et al.*, 2001; Huntly, *et al.*, 2002]. Sin embargo, esta discordancia entre la falta de expresión y ausencia de deleciones observables por FISH puede tener diversas causas. Primero, de los ocho pacientes sin expresión de *ABL1/BCR*, tres corresponden a pacientes con Ph variantes como resultado de un mecanismo de una sola etapa donde el gen recíproco *ABL1/BCR* no se forma ya que las secuencias de *BCR* son translocadas desde el cromosoma 22 a un tercer cromosoma involucrado y por consiguiente su expresión no es posible. Segundo, la ausencia de expresión en los 5 casos restantes, puede entenderse si se considera que las deleciones son de tamaño variable, y que éstas pueden estar por debajo del límite de resolución de la técnica de FISH (aproximadamente 80 kb) y sin embargo afectar una región clave para la expresión del recíproco. Es interesante indicar aquí que en el análisis genómico del rearreglo recíproco *ABL1/BCR* encontramos evidencia de diversas alteraciones moleculares asociadas (e.g., inserciones, deleciones, duplicaciones, inversiones) que aunque involucran pequeños segmentos de ADN en comparación con los tamaños relativos al análisis por FISH, podrían tener potencial para afectar sus niveles de expresión (e.g., rearreglo a nivel genómico *ABL1/BCR* paciente #4).

Varias líneas de evidencia sugieren que el nivel de expresión de *BCR/ABL1* condiciona directamente el fenotipo de las leucemias Ph positivas. Estos niveles de expresión *BCR/ABL1* pueden ser incrementados por un aumento en el número de

copias del gen quimérico [Gargallo *et al.*, 2003] o por una regulación positiva o estabilidad de sus transcritos [Bianchini *et al.*, 2009]. Un cromosoma Ph extra es una de las alteraciones secundarias más frecuentemente encontradas durante la evolución en LMC [Berstein, 1988; Heim & Mitelman, 2009; Fabarius *et al.*, 2015]. Por otro lado, la isoforma p190^{Bcr/Abl1} encontrada en LLAs se considera de peor pronóstico y el resultado es una enfermedad más agresiva debido a una actividad TK más elevada que sus contrapartes p210^{Bcr/Abl1} y p230^{Bcr/Abl1} [Clark *et al.*, 1988; Mullighan, 2013; Shai, 2014].

El mecanismo subyacente detrás del mal pronóstico asociado a las deleciones sobre el der(9) es desconocido aunque se han propuesto diversas hipótesis. Entre ellas clasificamos: (a) las que involucran un aumento de expresión de *BCR/ABL1* y (b) las afectan vías metabólicas alternativas.

Entre las hipótesis tipo (a) distinguimos: (a, i) Las deleciones sobre el der(9) se asocian a inestabilidad cromosómica aumentada. En esa situación, las deleciones reflejarían una predisposición a la adquisición de subsecuentes alteraciones cromosómicas (Ph extra, ider(22) o amplificación en tándem del Ph) en el clon maligno. Nuestro análisis, en concordancia con otros reportes, no mostró evidencia que sugiera que las deleciones sobre el der(9) promuevan la aparición de estas alteraciones [Silly *et al.*, 1994; Huntly *et al.*, 2003; Bennour *et al.*, 2012]. (a, ii) Por otro lado, las deleciones sobre el der(9) podrían actuar como un marcador indirecto de pequeñas deleciones intrónicas sobre el cromosoma Ph, aumentando eventualmente los niveles de expresión de *BCR/ABL1* [Huntly *et al.*, 2003]. Sin embargo, el análisis de los niveles de expresión de *BCR/ABL1* de nuestros casos con deleciones sobre el der(9) al momento del diagnóstico no mostró diferencias significativas con los pacientes sin deleciones. En consecuencia, nuestra evidencia no sustenta ninguna de éstas dos hipótesis (a, i) y (a, ii).

(b) Una de las hipótesis más aceptadas sobre el mecanismo de acción de las deleciones sobre el der(9) es que éstas afectan genes supresores de tumor (GST) dentro de la región ya que la zona delecionada es grande comprendiendo varias megabases [Huntly *et al.*, 2003; Xinh *et al.*, 2006]. Algunos estudios previos empleando un análisis de micro satélites identificaron varios GSTs mapeando en la zona delecionada, entre ellos se encontraban: *ASS1*, *PTGES* y *SMARCB1* [Specchia *et al.*, 2004]. El posible rol de estos genes en la patogénesis de LMC es desconocido.

Los GSTs son el blanco de muchas de las alteraciones genéticas observadas en cáncer. En líneas generales, ambos alelos del GSTs deberían ser mutados para observar un efecto fenotípico [Knudson, 1985]. Sin embargo, se ha observado en algunos casos que la pérdida de una sola de las copias del GST es suficiente para promover la expansión neoplásica (haplo-insuficiencia) [Fero *et al.*; 1998; Cook & McCaw, 2000; Quom & Berns, 2001; Lynch & Milner, 2006; Berger & Pandolfi, 2011].

El gen *ASS1* está ubicado en 9q34 a 212 kb río arriba del gen *ABL1* y codifica una proteína que cataliza uno de los pasos finales de la síntesis de arginina biosintética. El silenciamiento transcripcional dependiente de metilación ha sido demostrado como un mecanismo que disminuye la expresión de *ASS1* en hepatocarcinomas, cánceres mesoteliales, urológicos, melanomas, sarcomas y algunos linfomas, aunque no pueden descartarse otros mecanismos como la represión del promotor o la delección del gen [Tsai *et al.*, 2009; Delage *et al.*, 2010; 2012; Huang *et al.*, 2013; Phillips *et al.*, 2013; Allen *et al.*, 2014].

ASS1 es el gen más cercano al punto de ruptura en *ABL1*. Nuestros resultados muestran una disminución altamente significativa en la expresión de *ASS1* en pacientes con deleciones sobre el der(9) respecto de pacientes sin deleciones y controles, indicando que el alelo no afectado por la translocación sobre el cromosoma 9 normal, no es capaz de suplir la actividad del alelo delecionado sobre el der(9), indicando muy probablemente haplo-insuficiencia de *ASS1*.

Si bien se desconoce la actividad patogénica de *ASS1* en LMC, la disminución de su actividad podría reprogramar el metabolismo de la arginina en las células leucémicas, promoviendo el uso de arginina exógena [Phillips *et al.*, 2013]. Se ha demostrado que la arginina extracelular aumenta la síntesis de ADN en linfoma de Burkitt y células de cáncer colorrectal [Osunkoya *et al.*, 1970; Yamauchi *et al.*, 2003]. Este mecanismo ha sido propuesto también para explicar los fenotipos más agresivos en hepatocarcinomas, cánceres mesoteliales y cánceres urológicos, donde la expresión de *ASS1* está suprimida. [Phillips *et al.*, 2013]. La disminución de actividad de *ASS1* por haplo-insuficiencia debida a deleciones sobre el der(9) podría promover un fenotipo más agresivo en LMC promoviendo una mayor síntesis de ADN al desregular el metabolismo de la arginina.

El gen *PTGES* está ubicado en 9q34 a 950 kb río arriba de *ABL1*. Codifica para una enzima involucrada en el paso final de la síntesis de Prostaglandina E2 (PGE2), siendo la actividad de *PTGES* una limitante de los niveles de PGE2.

La actividad de *PTGES* respecto al desarrollo neoplásico es controversial en la literatura. La desregulación de los niveles de *PTGES* ha sido vinculada a una variedad de tumores entre los que se incluyen el carcinoma hepatocelular, cáncer de estómago, mamas, hígado, pulmón, páncreas, próstata y colon [Mehrotra *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Hasan *et al.*, 2008; Zang *et al.*, 2013]. Algunos trabajos han comprobado que *PTGES* puede actuar como supresor de tumores mediante una actividad antitumoral [Wang & DuBois, 2006; Lalier *et al.*, 2007]. En contraste, otros trabajos mostraron que un aumento de *PTGES* en cáncer colorectal, cáncer de mama o carcinoma hepatocelular, permite la expresión de proteínas anti-apoptóticas, promoviendo la supervivencia y la proliferación celular, definiendo una actividad claramente oncogénica [Samuelsson *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Hanaka *et al.*, 2009].

Nuestro análisis mostró que los niveles de expresión de *PTGES* son significativamente superiores en pacientes con LMC respecto de los controles, sugiriendo que en el contexto de la LMC, *PTGES* podría jugar un rol oncogénico clásico, donde su actividad estaría vinculada a la supervivencia y la proliferación celular de los clones neoplásicos.

Debido a que no se hallaron diferencias significativas en la expresión de *PTGES* entre casos con y sin deleciones sobre el der(9), estimamos que esta paridad podría estar condicionada por el cuadro general metabólico de la LMC, o alternativamente, porque la extensión de las deleciones no abarcarían el *locus PTGES* y no lo afectarían. Respecto a esta última hipótesis, la sonda de *ABL1* empleada en los estudios de FISH cubre una región total de 1100 Kb, mientras que *PTGES* se ubica a 950 Kb río arriba de *ABL1*, sobre la zona más distal de cobertura de la sonda. Debido al límite de resolución de FISH (80 – 100 Kb), existe la posibilidad que una proporción de casos con deleciones que no involucran a *PTGES*, generen falsos positivos que sobreestimen artificialmente el número de deleciones involucrando al *locus PTGES* en el der(9).

El gen *SMARCB1* se encuentra en el *locus* 22q11 a 460 kb río abajo del gen *BCR*. La proteína codificada, es parte de un complejo proteico que remodela la

cromatina y participa tanto en la activación como en la supresión de la expresión de genes. Diversas mutaciones que suprimen su actividad han sido asociadas a tumores rabdoides malignos y meningiomas [Biegel *et al.*, 1999; Oike *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2013].

Nuestro análisis de expresión no mostró diferencias en el nivel de *SMARCB1* entre pacientes con y sin deleciones sobre el der(9). Este resultado indica que el alelo normal es capaz de suplir la ausencia del alelo delecionado, por lo que la haploinsuficiencia parece no ser el mecanismo que afecte la actividad de *SMARCB1* en LMC. Evidencia de ello proviene de trabajos de investigación en ratones y tumores rabdoides humanos, que indican que es la supresión de ambos alelos la que promueve un fenotipo más agresivo de cáncer con tumores más invasivos y frecuentemente metastásicos a nodos linfáticos cercanos [Klochender-Yeivin *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2000, 2002; Kima & Roberts, 2014].

De los tres genes analizados, solo la expresión de *ASS1* fue afectada significativamente por la deleción en el der(9). Sin embargo, la región delecionada es grande, y otros GST como *GSTT1* (Glutation S transferasa Theta 1), ubicado entre *ASS1* y *PTGES*, podrían verse afectados como postuló Specchia y colaboradores [Specchia *et al.*, 2004]. Nuestros datos constituyen evidencia en favor de la hipótesis de que las deleciones sobre el der(9) pueden afectar GST por el mecanismo de haploinsuficiencia.

El posible rol de las deleciones sobre el der(9) respecto de su valor pronóstico es controversial. Antes del uso de ITKs como terapéutica de primera línea en el tratamiento de LMC, muchos estudios encontraron una relación directa entre la presencia de la deleción y características pronósticas adversas [Sinclair *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2001; Loncarevic *et al.*, 2002; Huntly *et al.*, 2003].

Estudios comparativos de pacientes con deleciones tratados con ITKs parecen no mostrar diferencias en la sobrevida total o duración de la respuesta hematológica, citogenética o molecular, respecto de pacientes sin deleciones, sugiriendo que los ITKs son capaces de superar el mal pronóstico de las deleciones sobre el der(9) [Quintas-Cardama *et al.*, 2006; Castagnetti *et al.*, 2010, Bennour *et al.*, 2012; Baccarani *et al.*, 2013]. Sin embargo, otros reportes han encontrado que incluso con tratamiento con ITKs, éstos solo son capaces de superar parcialmente el peor

pronóstico de las deleciones sobre el der(9) [Gorusu *et al.*, 2007; Vaz de Campos *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008].

Nuestro análisis evaluó los niveles de respuesta hematológica, citogenética y molecular alcanzados a los seis y 12 meses de iniciado el tratamiento con ITKs, tanto en pacientes con y sin deleciones, no hallando diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, el análisis de OR mostró una tendencia en los primeros seis meses de tratamiento, que señala que pacientes con deleciones vs sin deleciones sobre el der(9) tienen tres veces menos probabilidad de lograr la RHC, y dos y cuatro veces menos de obtener RCgMa y RM ≥ 3 log, respectivamente. Esta tendencia disminuye a medida que aumenta el tiempo de tratamiento con ITKs (OR: RHC: 1,6; RCgMa: 1,5 y RM ≥ 3 log: 1,8), indicando que el inhibidor es capaz de equiparar los diferentes niveles de respuesta con tiempos más prolongados, aunque todavía al año de tratamiento puede observarse el efecto negativo de las deleciones (OR>1, no significativo).

Aunque el número de casos en la serie analizada es pequeño, la tendencia encontrada sugiere que las deleciones pueden demorar la obtención de RHC, RGgMa y RM ≥ 3 log. En consecuencia, debido a que la terapia con ITKs no es capaz de superar del todo el efecto de las deleciones en der(9), éstas constituyen una señal de alerta (*warning*) a tener en cuenta en la respuesta a tratamiento en LMC [Gorusu *et al.*, 2007; Vaz de Campos *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008].

- El rearreglo genómico molecular *BCR/ABL1* en LMC: Aplicación clínica.

Dado el gran tamaño de la región de ruptura en *ABL1*, la secuencia de fusión *BCR/ABL1* genómica es virtualmente única y específica para cada paciente.

En la actualidad, la evaluación de EMR es generalmente realizada mediante metodologías que evalúan el nivel de expresión del gen quimérico *BCR/ABL1*. Con lo cual, en pacientes con niveles de respuestas indetectables con diferente niveles de profundidad (RM 4.0, 4.5 y 5.0) la qRT-PCR no es capaz de determinar si la ausencia del transcripto *BCR/ABL1* se debe a la quiescencia del clon neoplásico o la total erradicación del mismo.

Desde un punto de vista clínico, una PCR-PE de alta sensibilidad sobre ADN genómico puede constituir un examen complementario poderoso e informativo que

podría discriminar entre la presencia o ausencia del clon neoplásico en casos donde el paciente alcance niveles indetectables de *BCR/ABL1*, identificando así, candidatos para protocolos de interrupción de tratamiento con ITKs [Melo & Ross, 2011].

La caracterización molecular completa del rearrreglo genómico *BCR/ABL1* en LMC constituye un reto, tanto experimental dada la relativa complejidad de los métodos involucrados, como también económico, característica particularmente sensible en países en desarrollo [Livarhova et al., 2015, Ross et al., 2010].

Nosotros, empleando un esquema original basado en PCR-inversa de larga distancia (I-LD-PCR) fuimos capaces de caracterizar el rearrreglo *BCR/ABL1* y de diseñar una reacción de amplificación PCR de alta sensibilidad para detección de enfermedad mínima residual paciente-específico (PCR-PE) sobre muestras de ADN genómico. Esta amplificación específica permitió amplificar y detectar la presencia del clon neoplásico durante todo el seguimiento de los pacientes (casos #1, #2, #3 y #4) en paralelo con los estudios de qRT-PCR.

Los pacientes #1, #2 y #4 lograron RMMa (3 log de reducción del transcripto *BCR/ABL1*), mientras que el paciente #3 logró una RM 4.0 (4 log de reducción del transcripto) a los 12 meses de tratamiento, la que luego perdió, llegando a una RMMa.

Tanto la RMMa como la RM 4.0 constituyen respuestas importantes en el tratamiento de la LMC. Si bien no pudimos evaluar nuestra metodología con respuestas más profundas (RM^{4.5} y RM^{5.0}), consideramos que esta PCR-PE tiene un potencial de sensibilidad aún mayor al que pudimos determinar en nuestro análisis, superior a qRT-PCR y que será capaz de amplificar el clon neoplásico en casos con RM^{4.5} o RM^{5.0}. Evidencia de ello proviene de la literatura, donde PCRs *BCR/ABL1* sobre ADN genómico caso-específicas fueron capaces de amplificar el rearrreglo genómico en el 80% de pacientes con LMC con más de 18 meses de tratamiento con ITKs y RM ≥ 4.5 log de reducción, indicando que el clon leucémico residual permanece quiescente [Ross et al., 2010; Score et al., 2010]. La estimación de la sensibilidad de la metodología de investigación PCR-PE sobre ADN es al menos 10 veces superior a la medición relativa del nivel de transcriptos *BCR/ABL1*, y resulta equivalente a un límite de detección hasta 6.0 log de reducción [Ross et al., 2010].

Por otro lado, el abordaje de I-LD-PCR presentado en este trabajo, tiene la ventaja por sobre el método de amplificación LD-PCR múltiple descrito por Ross et al. (2010) en que presenta una relativa sencillez de ejecución al reducir el número de reacciones de PCR-LD (una simplex inversa vs seis reacciones multiplex directas). Asimismo, ambos abordajes de caracterización permiten aplicar alternativamente o secuenciación de Sanger, o secuenciación masiva paralela (MPS) adaptándose a la disponibilidad de equipamiento y recursos de cada laboratorio. Nuestra metodología ha probado ser reproducible y podría constituir un gran aporte para el seguimiento de casos de LMC (o virtualmente cualquier patología que implique rearrreglos genómicos), de bajo costo y alta sensibilidad, la que en conjunto con técnicas de qRT-PCR, pueden brindar información de gran valor y confiabilidad que permita la selección de pacientes candidatos para protocolos de interrupción de tratamiento con ITKs.

- El rearrreglo genómico molecular *BCR/ABL1* en LMC: Caracterización del evento molecular y estimación del mecanismo.

La caracterización del rearrreglo genómico *BCR/ABL1* y su recíproco *ABL1/BCR*, nos permitió la posibilidad de analizar el origen de la translocación en 6 casos.

Todo el análisis de nuestros datos puede enmarcarse en dos grandes familias de modelos teóricos. La primera, incluye a modelos vinculados a la reparación del ADN (NAHR, del inglés *non allelic homologous recombination* y NHEJ, del inglés *non-homologous end joining*) [Szostak et al., 1983; Moore & Harber, 1996], y la segunda comprende modelos que han sido asociados a la síntesis del ADN (BIR, del inglés *Break-Induced Replication* y FoSTeS, del inglés *Fork Stalling and Template Switching*) [Smith et al., 2007; Lee et al., 2007; Hastings et al., 2009].

El modelo NAHR requiere de la interacción de grandes regiones de homología de secuencia (>300 pb) para reparar la ruptura generada en la hebra de ADN mientras que NHEJ no requiere molde o secuencias homólogas (sin embargo, se han encontrado algunos casos asociados a micro-homologías de 2-5 pb) [Rothkamm et al., 2003]. Por otro lado, los modelos BIR y FoSTeS son consecuencia del colapso de la horquilla de replicación (e.g., colapso debido a una ruptura o a la formación de una estructura secundaria en el ADN, con posterior “salto” a otra región genómica). La diferencia principal entre éstos modelos está en el número de veces que la nueva hebra sintetizada “salta” a otra región genómica (saltos en la síntesis del

ADN) y la longitud de homología necesaria entre las distintas regiones involucradas [Smith *et al.*, 2007; Hastings *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2007].

Cada uno de los casos descritos en este apartado mostró heterogeneidad en las secuencias halladas en los puntos de ruptura de ambos genes quiméricos por lo que podemos afirmar que no existe una secuencia específica asociada al rearrreglo *BCR/ABL1* o su recíproco.

Los seis pacientes analizados mostraron elementos repetitivos cortos característicos (e.g., *Alu* (SINE), hAT-Charlie, microsatélites (STRs), etc.) sobre o cercanos a sus puntos de ruptura.

Al igual que nosotros, varios autores han encontrado una elevada frecuencia de elementos repetitivos interdispersos en cercanía a los puntos de ruptura de *BCR* y *ABL1* en LMC [Jiang *et al.*, 1990; Jeffs *et al.*, 1998; Matarucchi *et al.*, 2008; Score *et al.*, 2010]. Los elementos repetitivos, en particular los elementos *Alu*, han sido ampliamente vinculados a la estimulación de rupturas sobre o en su vecindad [Deninger & Batzer, 1999; Wagstaff *et al.*, 2012] lo que podría explicar la elevada frecuencia que nosotros y otros han encontrado en la cercanía a los puntos de ruptura en el rearrreglo genómico *BCR/ABL1* y su recíproco [Jiang *et al.*, 1990; Jeffs *et al.*, 1998; Matarucchi *et al.*, 2008; Score *et al.*, 2010].

Asimismo, estos elementos repetitivos (i.e., LINE y SINE) pueden tener un importante rol suplementario en el origen del rearrreglo *BCR/ABL1* a través del apareamiento orientado de sus copias, mediando y favoreciendo un acercamiento y estabilización de las regiones involucradas en la translocación, en un proceso denominado sinapsis ectópica [Liu *et al.*, 2012] (figura 1).

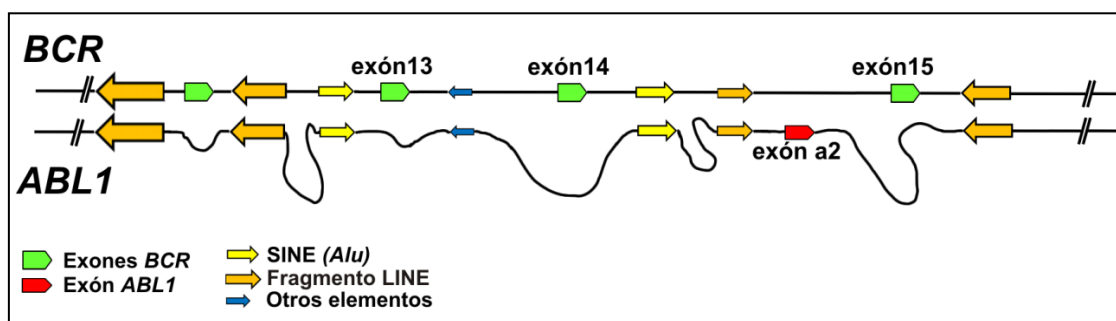


Figura 1: Esquema del modelo de sinapsis ectópica. Se muestran como ejemplo algunos elementos repetidos (e.g., SINEs (amarillo), fragmentos de LINEs (naranja), y otros elementos (azul)) que participan en la estabilización de las regiones intragénicas cercanas los puntos de ruptura de ambos genes. Exones de *BCR* (verde), exón a2 de *ABL1* (rojo).

Por otra parte, además de los elementos repetitivos, todos nuestros casos mostraron pequeños motivos recombinogénicos en o muy cercanos a los puntos de ruptura. En la literatura estas secuencias recombinogénicas han sido indicadas como generadoras de rupturas (i.e., *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites*, *Vaccinia topoisomerase I consensus*, *Deletion hotspot consensus*, *Ig heavy chain class switch repeat*) [Been *et al.*, 1984; Shuman, 1991; Krawczak & Cooper, 1991; Rabbitts *et al.*, 1981] o asociadas a la detención o pausa de la ADN polimerasa (i.e., *DNA polymerase pause site core sequence*, *DNA polymerase arrest site*, *DNA polymerase alpha/beta frameshift hotspot*) [Weaver *et al.*, 1982; Kunkel, 1991; Vissers *et al.*, 2009].

En nuestra serie, los motivos más frecuentemente encontrados fueron los asociados a rupturas del ADN, en particular, *Vertebrate/plant topoisomerase I consensus cleavage sites*. Estas secuencias presentan una probabilidad relativamente alta de aparición a lo largo del genoma humano (1/32 aproximadamente). Sin embargo, estos motivos, junto a otros, menos frecuentes pero también vinculados a rupturas sobre el ADN, estuvieron presentes en no menos de cuatro repeticiones en posiciones muy cercanas a los puntos de ruptura señalando su probable rol en la generación de rupturas en el ADN. En mamíferos, todos estos motivos han sido asociados a la producción de cortes con posterior reunión produciendo intercambio de cadenas de ADN en procesos como la recombinación, replicación y transcripción [Been, 1984; Shuman, 1991; Vissers *et al.*, 2009].

Por otra parte, los pacientes #1, #2, #3, #4 y #6 presentaron micro-homologías (3 a 7 pb) entre los sitios de ruptura. Además, los casos #1 y #3, junto al paciente #5 presentaron cicatrices moleculares identificadas como pequeñas deleciones, duplicaciones e inserciones sobre los puntos de ruptura de *BCR/ABL1* y *ABL1/BCR*.

En los casos #4 y 6#, y a diferencia de los demás (#1, #2, #3 y #5), los rearreglos quiméricos presentaron un mayor grado de complejidad. El paciente #4, presentó una duplicación bidireccional que insertó 295 pb sobre el rearreglo *ABL1/BCR* que afectó la secuencias aceptoras de *splicing* (incluyendo la caja de pirimidinas y AG yuxtapuesto al extremo 5' exón) anulando así la expresión de *ABL1/BCR*. Este evento es evidencia de que además de las deleciones sobre el

der(9), existen otros eventos genómicos que pueden anular la expresión del gen quimérico recíproco.

El paciente #6 presentó una inversión que afectó las primeras 73 pb de la porción *ABL1* del gen quimérico *BCR/ABL1* junto a una gran delección sobre el der(9) que no permitió la caracterización del gen quimérico recíproco *ABL1/BCR*.

Las características encontradas en nuestra serie de pacientes nos permiten sugerir la presencia de al menos dos mecanismos diferentes actuando sobre la generación del rearreglo *BCR/ABL1*. Por un lado, los pacientes #1, #2, #3 y #5, con alta frecuencia de motivos relacionados a rupturas del ADN, presencia de micro-homologías en los sitios de ruptura y cicatrices moleculares sugieren que el rearreglo genómico *BCR/ABL1* es consecuencia de NHEJ [Lieber, 2008; Woods-Samuels *et al.*, 1991]. Sin embargo, las características encontradas no permiten descartar la posibilidad de un mecanismo como BIR mediado por micro-homologías [Slack *et al.*, 2006; Vissers *et al.*, 2009]. La elección de NHEJ respecto de BIR proviene de la literatura. Por un lado, algunas investigaciones sobre la maquinaria enzimática activa durante la reparación del ADN en modelos *in vitro*, han sugerido que NHEJ es el mecanismo más frecuentemente involucrado en LMC [Tobin *et al.*, 2013]. Por el otro lado, reportes previos similares al nuestro con análisis genómicos de la translocación t(9;22) han señalado que la mayor parte de los rearreglos *BCR/ABL1* en pacientes con LMC parecen ser el resultado de NHEJ [Jefferis *et al.*, 1998; Matarucchi *et al.*, 2008; Score *et al.*, 2010].

En el caso de los pacientes #4 y #6, las características y el nivel de complejidad de los rearreglos encontrados son mejor descritos por un modelo como FoSTeS, donde rupturas en el ADN producen un colapso en la horquilla de replicación promoviendo múltiples saltos (paciente #4 con cuatro saltos (figura 3) y paciente #6 dos saltos) de la ADN polimerasa sobre diferentes regiones del genoma [Colnaghi *et al.*, 2011].

Es necesario indicar que el análisis bioinformático y estimación de los mecanismos postulados constituyen una mera especulación de análisis teórico y no implican la certeza de un mecanismo de origen específico.

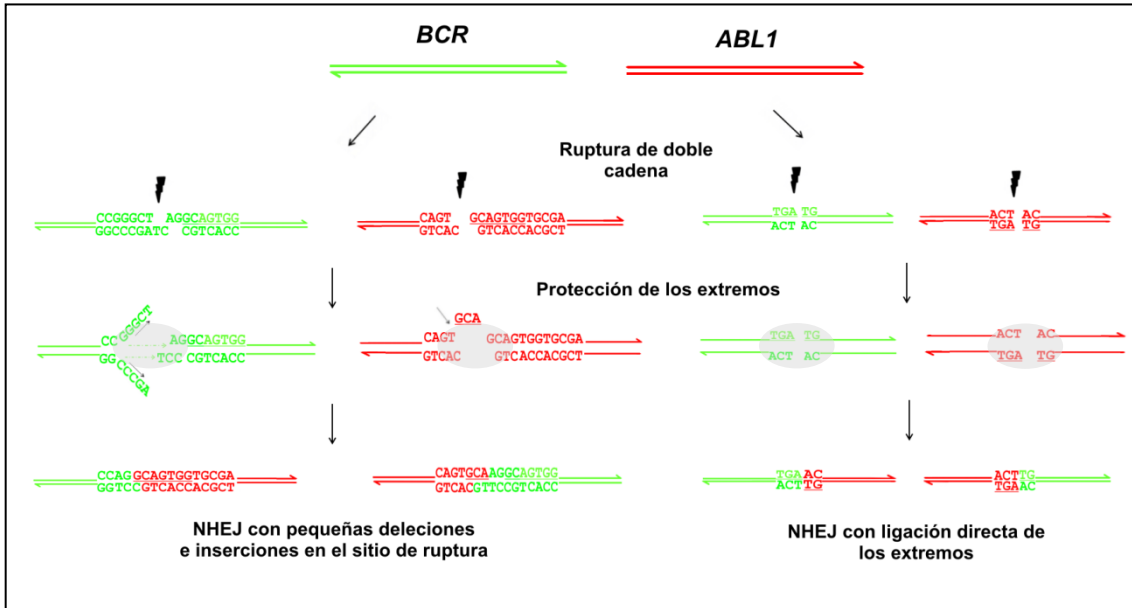


Figura 2. Esquema de NHEJ asociado a reparación de rupturas en el ADN. Paciente #1 (panel izquierdo): reparación de rupturas dejando pequeñas *indels* sobre los sitios (cicatrices moleculares). Paciente #2 (panel derecho): ligación directa de extremos romos. El círculo gris muestra el complejo proteico protector de los extremos de las cadenas a reparar.

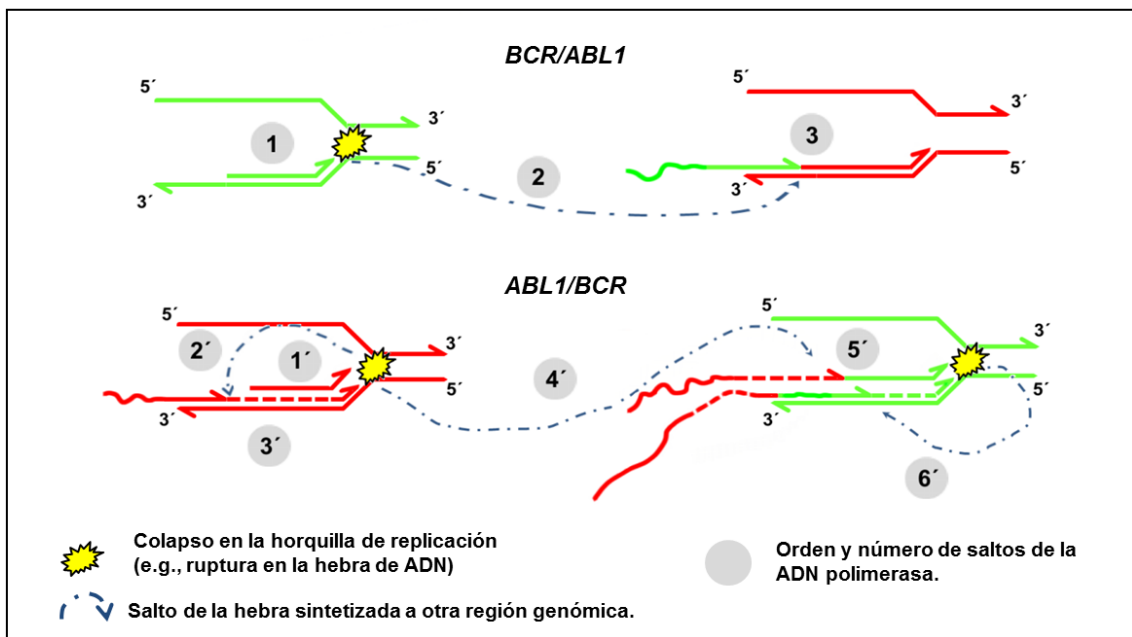


Figura 3. Representación esquemática del modelo FoSTeS en el paciente #4. Generación del rearreglo *BCR/ABL1* (panel superior): (1) síntesis en *BCR*, (2) colapso de la horquilla de replicación y salto hacia *ABL1*, (3) síntesis en *ABL1*. Generación del rearreglo *ABL1/BCR* (panel inferior): (1') síntesis en *ABL1*, (2') colapso de la horquilla de replicación y salto hacia atrás en *ABL1*, (3') re-síntesis del intervalo en *ABL1*, (4') colapso de la horquilla de replicación y salto hacia *BCR*, (5') síntesis sobre *BCR* y colapso de la horquilla de replicación, (6') salto hacia atrás y re-síntesis de intervalo en *BCR*. Se indican en verde las secuencias de *BCR* y en rojo las secuencias de *ABL1*.

Los datos presentados en este trabajo, incluyendo la presencia de deleciones sobre el der(9), su origen y su valor pronóstico; la haploinsuficiencia de genes

cercanos al sitio de la translocación, la expresión de diferentes isoformas de *BCR/ABL1* y su recíproco *ABL1/BCR*, la heterogeneidad de secuencias del rearreglo y los hipotéticos mecanismos implicados en el origen de la t(9;22) indican que la LMC es una patología compleja, heterogénea en su origen, y asociada a múltiples características y factores, que hacen de cada paciente un caso único que requiere una caracterización personalizada involucrando necesariamente la combinación de abordajes citogenéticos, cito-moleculares y moleculares.

En otro orden de análisis, los desarrollos presentados en este trabajo, en particular la caracterización del rearreglo genómico *BCR/ABL1*, constituyen una mejora significativa en la costo-efectividad y rapidez para la obtención de PCR-PE. Esta herramienta de alta sensibilidad para investigación de enfermedad mínima residual en pacientes con LMC es de utilidad crítica para evaluar la interrupción del tratamiento con ITKs. Estas características, la convierten en una metodología ideal para el análisis de la translocación t(9;22) por PCR aplicable a todos los estamentos de la sociedad, aun en países con recursos limitados.

Conclusiones

Teniendo en cuenta lo anteriormente expresado, los estudios efectuados en el presente trabajo permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

- En la población Argentina con LMC analizada, el promedio de edad (45,2), relación de sexos (1,03 hombres/mujeres), características clínicas (esplenomegalia 4,35 cm, leucocitos $146,5 \times 10^3/\mu\text{l}$, plaquetas $313,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ y hemoglobina 11,39g/dl), frecuencia de cromosoma Ph (93,5%), sus variantes (6,5%) y la proporción de casos con ACAs al diagnóstico (3,2%), así como las isoformas de *BCR/ABL1* encontradas (b3a2 (67,3%) y b2-a2 (32,7%), estuvieron en concordancia con la literatura.
- La frecuencia de deleciones sobre el der(9) fue de 23% (14/61), ligeramente superior a la reportada (20%) para pacientes con LMC al diagnóstico. Todas fueron de tamaño variable siendo la mayoría deleciones que afectaron tanto a secuencias de *ABL1* como de *BCR* (8/14; 57%), y en menor medida, deleciones solo de *BCR* (3/14; 21%). Los tres casos restantes (3/14; 21%) presentaron coexistencia de más de un clon (dos pacientes caracterizados por un clon Ph positivo clásico y un clon Ph positivo con deleciones sobre el der(9), y un paciente con dos clones Ph positivos, ambos con distintas deleciones en el der(9)).
- La evidencia cito-molecular (FISH) y molecular (expresión de *ABL1/BCR*) en casos con coexistencia de dos clones neoplásicos, demuestra que éstas deleciones no ocurrieron al mismo momento de producirse la translocación t(9;22) por lo que constituyen evolución clonal.
- La ausencia de expresión del gen recíproco *ABL1/BCR* se debe principalmente a deleciones sobre el der(9). Sin embargo, en una pequeña proporción de casos (8/47) ésta sería el resultado de otros fenómenos como las translocaciones variantes, o pequeños rearrreglos genómicos (inserciones, duplicaciones, deleciones etc) que afectarían las regiones intrónicas de *splicing*. Esta evidencia surge de la integración de los resultados citogenéticos, cito-moleculares, de expresión del recíproco *ABL1/BCR* y del análisis genómico de *ABL1/BCR*.
-

- El nivel de expresión de *BCR/ABL1* no mostró diferencias significativas entre los grupos de pacientes con (n=14) y sin deleciones (n=47) sobre el der(9).
- El nivel de expresión de *ASS1* disminuye significativamente ($p=0,0001$) en pacientes con deleciones sobre el der(9) sugiriendo un mecanismo de haploinsuficiencia sobre este GST.
- Los niveles de expresión de *PTGES* y *SMARCB1* no son afectados significativamente por la presencia de deleciones sobre el der(9). Sin embargo, éste es el primer reporte donde se registra un aumento de expresión de *PTGES* en LMC respecto de controles sin enfermedad. En este contexto, *PTGES* parece jugar un rol oncogénico clásico, donde su actividad estaría vinculada a la supervivencia y la proliferación celular del clon neoplásico.
- La presencia de deleciones sobre el der(9) no produjo diferencias significativas en la proporción de casos que alcanzaron RHC, RCgMa y $RM \geq 3$ log de reducción a los 6 y 12 meses de tratamiento con ITKs (n=60). Sin embargo, se registró una tendencia a demorar la respuesta al tratamiento en esta serie, caracterizada por valores de OR de 3,6 y 1,6 para RHC, de 2,6 y 1,5 para RCgMa, y de 4,5 y 1,8 para $RM \geq 3$ log a los 6 y 12 meses, respectivamente. En conclusión la presencia de deleciones sobre el der(9) constituiría una señal de alerta (*warning*) a tener en cuenta en la respuesta al tratamiento en LMC.
- Empleando un esquema original basado en PCR-inversa de larga distancia (I-LD-PCR) fuimos capaces de caracterizar el rearreglo *BCR/ABL1* y de diseñar una reacción de amplificación PCR de alta sensibilidad para detección de enfermedad mínima residual paciente-específica (PCR-PE) sobre muestras de ADN genómico en 6 casos de LMC.
- La PCR-PE pudo amplificar y detectar la presencia del clon neoplásico en todos los controles del tratamiento de los pacientes que fueron evaluados en paralelo junto al análisis por qRT-PCR mostrando una perfecta correlación.

- El abordaje de I-LD-PCR presentado en este trabajo es relativamente sencillo, de bajo costo y resulta en una mejora respecto a las metodologías utilizadas en la actualidad para la detección genómica del rearrreglo *BCR/ABL1*.
- Las características genómicas encontradas cercanos a los puntos de ruptura definidos en los pacientes de nuestra serie (elementos Alu, motivos recombinogénicos, cicatrices moleculares) nos permiten sugerir al menos dos mecanismos moleculares diferentes implicados en el origen de *BCR/ABL1*: 4 casos posiblemente asociados a NHEJ y dos a FoSTeS.

Referencias

- Abelson, H.T. y Rabstein, L.S. Lymphosarcoma: virus-induced thymic independent disease in mice. *Cancer research* , 30(8): 2213-2222. 1970.
- Allen, M.; Luong, P.; Hudson, C.; [et al]. Prognostic and therapeutic impact of arginine succinate synthetase-1 control in bladder cancer as monitored longitudinally by PET imaging. *Cancer Research*, 74(3):896-907. 2014.
- Anderson, A.; Olofsson, T.; Lindgren, D.; [et al]. Molecular signatures in childhood acute leukemia and their correlations to expression patterns in normal hematopoietic subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102: 19069-19074. 2005.
- Baccarani, M.; Saglio, G.; Goldman, J.; [et al]. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 108: 1809-1820. 2006.
- Baccarani M, Cortes J, Pane F, [et al]. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *Journal of Clinical Oncology*, 27:6041-6051. 2009.
- Baccarani, M.; Deininger, M.W.; Rosti, G.; [et al]. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, 122: 872-884. 2013.
- Been, M.D.; Burgess, R.R. y Champoux, J.J. Nucleotide sequence preference at rat liver and wheat germ type 1 DNA topoisomerase breakage sites in duplex SV40 DNA. *Nucleic Acids Res*, 12: 3097-3114. 1984.
- Beligoy, L.; Bengió, R.; Bordone, J.; [et al]. Guías de tratamiento y diagnóstico. Leucemia Mieloide Crónica. Sociedad Argentina de Hematología. (Edición 2015) Tomo II. 2015.
- Belli, C.; Alú, M.F.; Alfonso, G.; [et al]. Novel variant Ph translocation t(9;22;11)(q34;q11.2;p15)inv(9)(p13q34) in chronic myeloid leukemia involving a one-step mechanism. *Cytogenetic and Genome Research*, 132, 4: 304-308. 2011.
- Bennour, A.; Sennana, H.; Laatiri, A.; [et al]. Molecular Cytogenetic characterization of variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia: genesis and deletion of derivative chromosome 9. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 194:30-37. 2009.
- Bennour, A; Bellâaj, H; Youssef, YB; [et al]. Molecular cytogenetic characterization of Philadelphia-negative rearrangements in chronic myeloid leukemia patients. *Journal of Cancer Research in clinical Oncology*; 137: 1329 -1336. 2011.
- Bennour, A.; Ouahchi, I.; Youseff, Y.; [et al]. Molecular cytogenetic study of derivative chromosome 9 deletion in chronic myeloid leukemia patients. *Medical Oncology*, 29: 1151-1160. 2012.
- Bennour, A; Ouahchi, I.; Achour, B.; et al. Analysis of the clinico-hematological relevance of the breakpoint location within M-BCR in chronic myeloid leukemia. *Medical Oncology*, 30:348-352. 2013.
- Berger, A.H. y Pandolfi, P.P. Haplo-insufficiency: a driving force in cancer. *Journal of Pathology*, 223:137-146. 2011.

- Berstein, R. Cytogenetics of chronic myeloid leukemia. *Seminars in Hematology*, 25: 20-34. 1988.
- Bianchini, M.; De Brasi, C.; Gargallo, P.; [et al]. Specific assessment of BCR-ABL transcript overexpression and imatinib resistance in chronic myeloid leukemia patients. *European Journal of Haematology*, 82(4): 292-300.2009.
- Biegel. J.A.; Zhou, J.Y.; Rorke, L.B. [et al]. Germ-line and acquired mutations of INI1a atypical teratoid and rhabdoid tumours. *Cancer Research*, 59: 74-79. 1999.
- Branford, S.; Rudzki, Z. y Hughes, T.P. A novel BCR-ABL transcript (e8a2) with the insertion of an inverted sequence of ABL intron 1b in a patient with Philadelphia positive chronic myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 109:635–637. 2000.
- Branford, S.; Cross, NC.; Hochhaus, A.; et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 20, 1925–1930. 2006.
- Branford, S.; y Hughes, T. Diagnosis and monitoring of chronic myeloid leukemia by qualitative and quantitative RT-PCR. *Methods Mol Med*, 125:69-92. 2006.
- Castagnetti, F.; Testoni, N.; Luatti, S.; [et al]. Deletions of the derivative chromosome 9 do not influence the response and the outcome of chronic myeloid leukemia in early chronic phase treated with imatinib mesylate: GIMEMA CML Working Party analysis. *Journal of Clinical Oncology*, 28:2748-2754. 2010.
- Clark, S.S.; McLaughlin, J.; Timmons, M.; [et al]. Expression of distinctive BCR-ABL oncogene in Ph1-positive acute lymphocytic leukemia (ALL). *Science*, 239:775-777. 1988.
- Cohen, N.; Rozenfeld-Granot, G.; Hardan, I.; [et al]. Subgroup of patients with Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia characterized by a deletion of 9q proximal to ABL gene: expression profiling, resistance to interferon therapy, and poor prognosis. *Cancer Genet and Cytogenetics*, 128(2):114-9. 2001.
- Colnaghi, R.; Carpenter, G.; Volker, M.; [et al]. The consequences of structural genomic alterations in humans: genomic disorders, genomic instability and cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 22: 875-885. 2011.
- Cook, W.D. y McCaw, B.J. Accommodating haploinsufficient tumour suppressor genes in Knudson´s model. *Oncogene*, 19: 3434 – 3438. 2000.
- Cortes, J.E.; Talpaz, M.; O'Brien, S.; [et al]. Staging of Chronic Myeloid Leukemia in the Imatinib Era. An Evaluation of the World Health Organization Proposal. *Cancer* 106: 1306–1315. 2006.
- Cross, N.; White, H.; Müller, M.; [et al]. Standarized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 26(10): 2172 – 2175. 2012.
- Czepulkowski, B.H.; Bhatt, B. y Rooney, D.E. Analysis of Chromosomes from Bone marrow and Leukaemic Blood. *Human Cytogenetics A Practical Approach. Malignancy and Acquired Abnormalities. (2nd Edition). Vol 2, Cap 1. 1992.*
- Deninger, P.L. y Batzer, M.A. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab*, 67: 183-193. 1999.
- Deninger, M.W.; Goldman, J.M. y Melo, J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96(10):3343-3356. 2000.

- De la Fuente, J.; Merx K, Steer, E.j.; [et al]. ABL-BCR expression does not correlate with deletions on derivative chromosome 9 or survival in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 98: 2879-2880. 2001.
- Delage, B.; Fennell, D.A.; Nicholson, L.; [et al]. Arginine deprivation and arginine succinate synthetase expression in the treatment of cancer. *Int J Cancer*, 126: 2762-2772. 2010.
- Delage, B.; Luong, P.; Maharaj, L.; [et al]. Promoter methylation of argininosuccinate synthetase-1 sensitises lymphomas to arginine deiminase treatment, autophagy and caspase-dependent apoptosis. *Cell Death Disease*, 3:342-317. 2012.
- De Melo, V.A.; Milojkovic, D.; Marin, D.; [et al]. Deletions adjacent to BCR and ABL1 breakpoints occur in a substantial minority of chronic myeloid leukemia patients with masked Philadelphia rearrangements. *Cancer Genet Cytogenetics*, 182 (2): 111-115. 2008.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; [et al]. InfoStat. Grupo InfoStat, FCA. <http://www.infostat.com.ar>. 2013.
- Douet-Guilbert, A.; Morela, N., Quemenera, S.; [et al]. Deletion size characterization of der(9) deletions in Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 170: 89-92. 2006.
- Druker, B.J.; Sawyers, C.L.; Kantarjian, H.; [et al]. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *New England Journal of Medicine* 344:1038-1042. 2001.
- El-Zimaity, M.; Kantarjian, H.; Talpaz, M.; [et al]. Results of imatinib mesylate therapy in chronic myelogenous leukaemia with variant Philadelphia chromosome. *British Journal of Haematology*, 125: 187-195. 2004.
- Fabarius, A.; Leitner, A.; Hochhaus, A.; [et al] Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood*, 118: 6760-6768. 2011.
- Fabarius, A; Kalmanti, L; Dietz, CT. [et al] Impact of unbalanced minor route versus major route karyotypes at diagnosis on prognosis of CML. *Ann Hematol* ;94(12):2015-2024. 2015.
- Faderl, S.; Talpaz, M.; Estrov, Z.; [et al]. The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *The New England Journal Medicine*, 341, (3): 164-172. 1999.
- Fero, M.L.; Randel, E.; Gurley, K.E.; [et al]. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature*, 396:177-180. 1998.
- Fisher, A.M.; Strike, P.; Scott, C.; [et al]. Breakpoints of variant 9;22 translocations in chronic myeloid leukemia locate preferentially in the CG-richest regions of the genome. *Genes Chromosomes & Cancer*, 43:383-389. 2005.
- Fourouclas, N.; Campbell, P.J.; Bench, A.J.; [et al]. Size matters: the prognostic implications of large and small deletions of the derivative 9 chromosome in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, 91(7): 952-955. 2006.
- Frankfurt, O. y Licht, J.D. Ponatinib—A Step Forward in Overcoming Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 19(21): 5828-5834. 2013.
- Gargallo, P.M.; Cuello, M.T.; Aranguren, P.N.; [et al]. Amplification of the BCR/ABL fusion gene clustered on a masked Philadelphia chromosome in a patient

with myeloblastic crisis of chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 143, 2:140-144. 2003.

- Gorusu, M.; Benn, P.; Li, Z.; [et al]. On the genesis and prognosis of variant translocations in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 173:97-106. 2007.
- Grand, F.; Kulkarni, S.; Chase, A.; [et al]. Frequent Deletion of *hSNF5/INI1*, a Component of the SWI/SNF Complex, in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Research*, 59: 3870-3874. 1999.
- Hanakaa, H.; Pawelzikb, S.C.; Johnscenc, J.; [et al]. Microsomal prostaglandin E synthase 1 determines tumor growth in vivo of prostate and lung cancer cells. *PNAS*, 106(44): 18757–18762. 2009.
- Hasan, S.; Satake, M.; Dawson, D.W.; [et al]. Expression analysis of the prostaglandin E2 production pathway in human pancreatic cancers. *Pancreas*, 37:121-127. 2008.
- Hasford, J.; Pfirmann, M.; Hehlmann, R.; [et al]. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alpha. *Journal National Cancer Institute*, 90:850-858. 1998.
- Hastings, P.J.; Ira, G. y Lupski, J.R.. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS Genet*, 5: e1000327. 2009.
- Heim, S. y Mitelman, F. *Cancer Cytogenetics. Chronic Myeloid Leukemia*. Hoboken, New Jersey, Wiley Blackwell, a John Wiley & Sons, Inc., publication. (3rd Edition) 2009.
- Hiller, B.; Bradtke, J.; Balz, H.; [et al]. CyDAS Online Analysis. <http://www.cydass.org/OnlineAnalysis/>. 2004.
- Höglund, M.; Sandin, F. y Simonsson, F. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Ann Hematol* 94 (S2): S241–S247. 2015.
- Huang, H.Y.; Wu, W.R.; Wang, Y.H.; [et al]. ASS1 as a novel tumor suppressor gene in myxofibrosarcomas: aberrant loss via epigenetic DNA methylation confers aggressive phenotypes, negative prognostic impact, and therapeutic relevance. *Clin Cancer Research*, 19:2861-2872. 2013.
- Hughes, T.P.; Kaeda, J.; Brandford, S.; [et al]. Frequency of major molecular response to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 349(15): 1423-1432. 2003.
- Huntly B, Reid A, Bench A, [et al] Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. *Blood* 98: 1732-1738. 2001.
- Huntly, B.; Bench, A.; Delabesse, E.; [et al]. Derivative chromosome 9 deletions in chronic myeloid leukemia: poor prognosis is not associated with loss of ABL-BCR expression, elevated BCR-ABL levels, or karyotypic instability. *Blood* 99: 4547-4553. 2002.
- Huntly, B.; Bench, A. y Green, A. Double Jeopardy from a single translocation: deletions of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia. *Blood* 102: 1160-1168. 2003.

- Huntly B, Guilhot F, Reid A, [et al]. Imatinib improves but may not fully reverse the poor prognosis of patients with CML with derivative chromosome 9 deletions. *Blood* 102: 2205-2212. 2003.
- Jeffs, A.R.; Benjes, S.M.; Smith, T.L.; [et al] The BCR gene recombines preferentially with Alu elements in complex BCR-ABL translocations of chronic myeloid leukaemia. *Hum Mol Genet*, 7: 767-776. 1998.
- Johansson, B.; Fioretos, T. y Mitelman, F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematologica*, 107: 76-94. 2002.
- Jiang, X.; Trujillo, J.M. y Liang, J.C. Chromosomal breakpoints within the first intron of the ABL gene are nonrandom in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 76: 597-601. 1990.
- Jiang, X.; Smith, C.; Eaves, A.; [et al]. The challenges of targeting chronic myeloid leukemia stem cells. *Clinical Lymphoma and Myeloma* 2: 71-80. 2007.
- Kantarjian, H.M.; O'Brien, S.; Cortes, J.E.; Smith, T.L.; [et al]. Treatment of Philadelphia chromosome-positive accelerated-phase chronic myelogenous leukemia with imatinib mesylate. *Clinical Cancer Research* 8(7):2167-2176. 2002.
- Kantarjian, H.M.; Giles, F.; Wunderle, L.; [et al] Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *The New England Journal of Medicine* 354: 2542-2551. 2006.
- Kim, D.H.; Popradi, G.; Sriharsha, L.; [et al]. No significance of derivative chromosome 9 deletion on the clearance kinetics of BCR/ABL fusion transcripts, cytogenetic or molecular response, loss of response, or treatment failure to imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. *Cancer*, 113(4):772-781. 2008.
- Kima, K.H. y Roberts, C.W. Mechanisms by which SMARCB1 loss drives rhabdoid tumor growth. *Cancer Genetics*, 207(9):365-372. 2014.
- Klochendler-Yeivin, A.; Fiette, L.; Barra, J.; [et al]. The murine SNF5/INI1 chromatin remodelling factor is essential for embryonic development and tumor suppression. *EMBO Rep*, 1(6):500-506. 2000.
- Knudson, A.G. Hereditary cancer oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Research*. 45: 1437 - 1443. 1985.
- Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S, [et al]. Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood* 97: 3581-3588. 2001.
- Krawczak, M. y Cooper, D.N. Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Hum Genet*, 86:425-441. 1991.
- Kunkel, T.A. The Mutational Specificity of DNA Polymerase- β during *in Vitro* DNA. Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 260 (9): 5787-5796. 1984.
- Kurzrock, R.; Shtalrid, M.; Romero, P.; [et al]. A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Nature*, 325:631-635. 1987.
- Kurzrock, R.; Gutterman, J.U. y Talpaz, M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *New England Journal of Medicine* 319: 990-998. 1988.
- Kurzrock, R.; Kantarjian, H.M.; Druker, B.J.; [et al]. Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics. *Annals International Medicine*, 138, 10: 819-830. 2003.

- Lallier, L.; Cartron, P.F.; Pedelaborde F.; [et al]. Increase in PGE2 biosynthesis induces a Bax dependent apoptosis correlated to patients' survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 26: 4999–5009. 2007.
- Le Beau, M.M. Cytogenetic Analysis of Hematological Malignant Diseases. En: Barch, M.J. *The ACT Cytogenetics Laboratory Manual* (1991). 2º Ed. Cap 9.
- Lee, J.A.; Carvalho, C.M. y Lupski, J.R. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell*, 131: 1235-1247. 2007.
- Lieber, M. The Mechanism of Human Non homologous DNA End Joining. *The J. of Bio Chemistry*, 283(1): 1-5: 2008.
- Linhartova, J.; Hovorkova, L.; Soverini, S.; [et al]. Characterization of 46 patient-specific BCR-ABL1 fusions and detection of SNPs upstream and downstream the breakpoints in chronic myeloid leukemia using next generation sequencing. *Molecular Cancer*, 14:89. 2015.
- Liu, P.; Carvalho, C.M.; Hastings, P.J.; [et al]. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Curr Opin Genet Dev*, 22: 211-220. 2012.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25: 402-408. 2001.
- Loncarevic, I.F.; Römer, J.; Starke, H.; [et al] Heterogenic molecular basis for loss of ABL1-BCR transcription: deletions in der(9)t(9;22) and variants of standard t(9;22) in *BCR-ABL1*-positive chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 34(2):193-200. 2002.
- Lozzio, C.B. y Lozzio, B.B. Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line With Positive Philadelphia Chromosome. *Blood*, 45 (3):321-334. 1975.
- Luatti S, Castagnetti F, Marzocchi G, [et al]. Additional chromosomal abnormalities in Philadelphia-positive clone: adverse prognostic influence on frontline imatinib therapy: a GIMEMA Working Party on CML analysis. *Blood*, 120: 761-767. 2012.
- Lynch, C.J. y Milner, J. Loss of one p53 allele results in four fold reduction of p53 mRNA and protein: a basis for p53 haplo-insufficiency. *Oncogene*, 25:3463–3470. 2006.
- Marzocchi, G.; Castagnetti, F.; Luatti, S.; [et al]. Variant Philadelphia translocations: molecular-cytogenetic characterization and prognostic influence on frontline imatinib therapy, a GIMEMA Working Party on CML analysis. *Blood*, 117: 6793-6800. 2011.
- Mattarucchi, E.; Guerini, V.; Rambaldi, A.; [et al]. Microhomologies and interspersed repeat elements at genomic breakpoints in chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 47: 625–632. 2008.
- Mehrotra, S.; Morimiya, A.; Agarwa, I.B.; [et al] Microsomal prostaglandin E2 synthase-1 in breast cancer: a potential target for therapy. *Journal of Pathology*, 208: 356-363. 2006.
- Melo, J.V.; Gordon, D.; Cross.; [et al]. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 81: 158-165. 1993.
- Melo, J.V.; Myint, H.; Galton, D.A.G. [et al]. P190 BCR-ABL chronic myeloid leukaemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia? *Leukemia*, 8:208-211. 1994.

- Melo, J.V.; Hocchous, A.; Yan, X.H.; [et al]. Lack of correlation between ABL-BCR expression and response to Interferon- α in chronic myeloid leukemia. *British Journal of Hematology*, 92: 684-686. 1996.
- Melo, J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*, 10:751-756. 1996.
- Melo, J.V. y Ross, D.M. Minimal residual disease and discontinuation of therapy in chronic myeloid leukemia: can we aim at a cure? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*: 136-142. 2011.
- Mendizabal, D.M.; Garcia-Gonzalez, P. y Levine, P.H. Regional variations in age at diagnosis and overall survival among patients with chronic myeloid leukemia from low and middle income countries. *Cancer Epidemiology*, 37: 247 – 254. 2013.
- Mitelman, F; Johansson, B; Mertens, F. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer, <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>. 2016.
- Mkrtychyan, H.; Ghazaryan, S.; Avetisyan, G.; [et al]. Novel Complex t(V;9;22) rearrangements in three cases with chronic myeloid leukemia and a rare translocation in a case with classical Philadelphia chromosome. *Oncology Report*, 20: 99-104. 2008.
- Montaner, S.R.; Saniger, L. y Lacal, J.C. Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by Rho family of GTPases. *Journal of Biology Chemistry*, 273(21): 12779-12785. 1998.
- Moore, J.K. y Haber, J.E. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 16: 2164-2173. 1996.
- Mullighan, C.G. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*, 50: 314-24. 2013.
- Nacheva, E.; Holloway, T.; Brown, K.; [et al]. Philadelphia-negative chronic myeloid leukaemia: detection by FISH of BCR-ABL fusion gene localized either to chromosome 9 or chromosome 22. *British Journal of Haematology*, 87: 409–412.1994.
- National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, USA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>. 2016.
- Naumann, S. y Decker, H. Genesis of variant Philadelphia chromosome translocations in chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 147: 18-22. 2003.
- Nowell, P. y Hungerford, D. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of National Cancer Institute* 25: 85-109. 1960.
- Oike, T.; Ogiwara, H.; Nakano, T.; [et al]. Inactivating Mutations in SWI/SNF Chromatin Remodeling Genes in Human Cancer. *Japanese J of Clin Oncology*, 43(9)849–855. 2013.
- Olofsson, T.; Odeberg, H. y Olsson, I. Granulocyte function in chronic granulocytic leukemia. II. Bactericidal capacity, phagocytic rate, oxygen consumption, and granule protein composition in isolated granulocytes. *Blood*, 48 (4):581-93. 1976.
- Osman, E.A.; Hamad, K.; Fadl, E.; [et al]. Frequencies of BCR-ABL1 fusion transcripts among Sudanese chronic myeloid leukaemia patients. *Genet Mol Biol*, 33:229–231. 2010.

- Osunkoya, B.O.; Adler, W.H. y Smith, R.T. Effect of arginine deficiency on synthesis of DNA and immunoglobulin receptor of Burkitt lymphoma cells. *Nature*, 227:398-399. 1970.
- Paz y Mino, C.; Burgos, R.; Morillo, S.A.; [et al]. BCR-ABL rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador South America. *Cancer Genet Cytogenet*, 132:65–7. 2002.
- Phillips, M.M.; Sheaff, M.T.; Szlosarek, P.W. Targeting Arginine-Dependent Cancers with Arginine-Degrading Enzymes: Opportunities and Challenges, *Cancer Res Treatment*; 45(4):251-262. 2013.
- Quintas-Cardama, A.; Kantarjian, H.; Talpaz, M.; [et al]. Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 105: 2281-2286. 2006.
- Quom, K.C. y Berns, A. Haplo-insufficiency? Let me count the ways. *Genes and Development*, 15: 2917-2921. 2001.
- Rabbitts, T.H.; Forster, A.; y Milstein, C.P. Human immunoglobulin heavy chain genes: evolutionary comparisons of C μ C δ and C γ genes and associated switch sequences. *Nucleic Acids Research*, 18(9):4509-4524. 1981.
- Redaelli, S.; Piazza, R.; Rostagno, R.; [et al]. Activity of Bosutinib, Dasatinib, and Nilotinib Against 18 Imatinib-Resistant BCR/ABL Mutants. *Journal of Clinical Oncology*, 27(3): 469-471, 2009.
- Reddy, K.S. y Sulcova, V. A FISH study of variant Philadelphia rearrangements. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 118:121–131. 2000.
- Reid, A.G.; Huntly, B.J.; Grace, C.; [et al]. Survival implications of molecular heterogeneity in variant Philadelphia-positive chronic myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 121:419-427. 2003.
- Richerbourg, S.; Eclache, V.; Perot, C.; [et al]. Mechanisms of genesis of variant translocation in chronic myeloid leukemia are not correlated with ABL1 or BCR deletion status or response to imatinib therapy. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 182: 95-102. 2008.
- Rothkamm, K.; Krüger, I.; Thompson, L.H.; [et al]. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol*, 23: 5706-5715. 2003.
- Roberts, C.W.; Galusha, S.A.; McMenamin, M.E.; [et al]. Haploinsufficiency of Snf5 (integrase interactor 1) predisposes to malignant rhabdoid tumors in mice. *Proc Natl Acad Science of USA*, 97:13796-13800. 2000.
- Roberts, C.W.; Leroux, M.M.; Fleming, M.D.; [et al]. Highly penetrant, rapid tumorigenesis through conditional inversion of the tumor suppressor gene Snf5. *Cancer Cell*, 2:415-425. 2002.
- Rosenberg, N. y Witte, O.N.. The viral and cellular forms of the Abelson (abl) oncogene. *Adv Virus Research*, 35:39-81. 1998.
- Ross, D.; Branford, S.; Seymour, J. [et al]. Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia*, 24: 1719-1724. 2010.

- Rossetti, L.; Radic, P.; Larripa, I.; [et al]. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6: 830–836. 2008.
- Rowley, J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243:290-293. 1973.
- Rowley, J.D. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annual Review of Genetics*, 32: 495-519. 1998.
- Rudduck-Sivaswaren, C.; Tien, S.L.; Lim, P; [et al]. Evidence for deletion of 9q as a two-step process in chronic myeloid leukemia. *Clinical Genetic*, 68: 461-465. 2005.
- Samuelsson, B.; Morgenstern, R. and Jakobsson, P.J. Membrane prostaglandin E synthase: A novel therapeutic target. *Pharmacol Rev*, 59: 207–224. 2007.
- Schmittgen, T.D. y Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 6(3): 1101-1108. 2008.
- Score, J.; Calasanz, M.; Ottman, H.; [et al]. Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanism of formation. *Leukemia* 24: 1742-1750. 2010.
- Shaffer, L.G.; McGowan-Jordan, J. y Schmid, M. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Karger, medical & scientific publisher. 2013.
- Shai, I. Beyond Philadelphia: ‘Ph-like’ B cell precursor acute lymphoblastic leukemias – diagnostic challenges and therapeutic promises. *Lymphoid biology and diseases*, 21(4): 289–296. 2014.
- Shepherd, P.; Suffolk, R.; Hasley, J.; [et al]. Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukaemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival. *British Journal of Haematology*, 89:546-554. 1995.
- Shi, J.; Whyte, W.A.; Zepeda-Mendoza, C.J.; [et al]. Role of SWI/SNF in acute leukemia maintenance and enhancer-mediated Myc regulation. *Genes and Development*, 27: 2648-2662. 2013.
- Shuman, S. Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific (prophage excision/DNA strand transferase/Holliday intermediate). *Proc. Natl. Acad. Sci*, 88: 10104-10108. 1991.
- Silly, H.; Chase, A.; Mills, K.; [et al]. No evidence for microsatellite instability or consistent loss of heterozygosity at selected loci in chronic myeloid leukaemia blast crisis. *Leukemia*, 8: 1923-1928. 1994.
- Sinclair P, Nacheva P, Leversha M, [et al]. Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 95: 738-43. 2000.
- Siu L, Ma E, Wong W, [et al]. Application of tri-colour, dual fusion fluorescence in situ hybridization (FISH) system for the characterization of BCR-ABL1 fusion in chronic myelogenous leukemia (CML) and residual disease monitoring. *BMC Blood Disorders*. <https://www.biomedcentral.com/1471-2326/9/4>. 2009.

- Slack, A.; Thornton, P.C.; Magner, D.B.; [et al]. On the mechanism of gene amplification induced under stress in *Escherichia coli*. *PLoS Genet*, 2: e48. 2006.
- Smith, C.E.; Llorente, B. y Symington, L.S. Template switching during break-induced replication. *Nature*, 447: 102–105. 2007.
- Sokal, J.E.; Cox, E. y Baccarini, M. Prognostic discrimination in “good risk” chronic granulocytic leukemia. *Blood*, 90:850-858. 1984.
- Sokal, J.E.; Baccarini, M.; Russo, D.; [et al]. Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. *Seminars of Hematology* 25:49-61.1988.
- Specchia G, Albano F, Anelli L, [et al]. Derivative Chromosome 9 Deletions in Chronic myeloid leukemia are associated with loss of tumor suppressor genes. *Leukemia & Lymphoma* 45, 4: 689-694. 2004.
- Stam, K.; Heisterkamp, N.; Reynolds, F.H.; [et al]. Evidence that the *ph1* gene encodes a 160,000-dalton phosphoprotein with associated kinase activity. *Molecular Cell Biology*.;7:1955-60. 1987.
- Szostak, J.W.; Orr-Weaver, T.L.; Rothstein, R.J.; [et al]. The double-strand break repair model for recombination. *Cell*, 33: 25-35. 1983.
- Talpaz, M.; Kantarjian, H.M. y McCredie, K.B. Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 69: 1280-1288. 1987.
- Tauchi, T, Okabe S, Miyazawa K, [et al]. The tetramerization domain-independent Ras activation by BCR-ABL oncoprotein in hematopoietic cells. *Int J Oncology*, 12:1269 - 1276. 1998.
- Tsai, W.B.; Aiba, I.; Lee, S.Y.; [et al]. Resistance to arginine deiminase treatment in melanoma cells is associated with induced arginine succinate synthetase expression involving c-Myc/HIF-1alpha/Sp4. *Mol Cancer Therapy*, 8:3223-3233. 2009.
- Tobin, L.A.; Robert, C.; Rapoport, A.P. [et al]. Targeting abnormal DNA double strand break repair in tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemias. *Oncogene*. , 32(14): 1784–1793. 2013.
- van Dongen, J.; Macintyre, E.A.; Gabert, J.A.; [et al]. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*, 13: 1901–1928. 1999.
- Van Etten, R.A. Cycling stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends of Cell Biology*, 5: 179-186. 1999.
- Vaz de Campos, M.G; Montesano, F.T.; Rodrigues, M.M. [et al]. Clinical implications of der(9q) deletions detected through dual-fusion fluorescence in situ hybridization in patients with chronic myeloid leukemia. 2007.
- Vissers, L.E.; Bhatt, S.S.; Janssen, I.M.; [et al]. Rare pathogenic microdeletions and tandem duplications are microhomology-mediated and stimulated by local genomic architecture. *Hum Mol Genet*, 18: 3579-3593. 2009.
- Wagstaff, B.J.; Hedges, B.J.; Derbes, R.S.; [et al]. Rescuing Alu: Recovery of New Inserts Shows LINE-1 Preserves Alu Activity through A-Tail Expansion. *Plos Genetic*, 8(8): 1-13: 2012.
- Waller, C.F.; Dennebaum, G.; Feldmann, C.; [et al.]. Long-Template DNA Polymerase Chain Reaction for the Detection of the *bcr/abl* Translocation in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia. *Clinical Cancer Research* 5: 4146–4151. 1999.
- Wang, D. y DuBois, R.N. Prostaglandins and cancer. *Gut* 55: 115–122. 2006.

- Wang, M.T.; Honn, K.V. y Nie, D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*, 26: 525–534. 2007.
- Wang, H.W.; Hsueh, C.T.; Lin, C.F.; [et al]. Clinical implications of microsomal prostaglandin E synthase-1 overexpression in human non-small-cell lung cancer. *Cancer Research*, 68:3251-3259. 2008.
- Weaver, D.T. y DePamphilis, M.L. Specific sequences in native DNA that arrest synthesis by DNA polymerase alpha. *J Biol Chem*, 257: 2075-2086.1982.
- Weisberg, E.; Manley, P.W.; Breitenstein, W.; [et al] .Characterization of AMNIO7,a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell*, 7:129-141. 2005.
- Wetzler, M.; Talpaz, M.; Van Etten, R.A.; [et al] Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *Journal of Clinical Investigation*, 92:1925-1939. 1993.
- Woods-Samuels, P.; Kazazian, H.H. y Antonarakis, S.E. Non homologous recombination in the human genome: deletions in the human factor VIII gene. *Genomics*, 10: 94-101. 1991.
- Xinh, P.T.; Vu, H.A.; Nghia, H.; [et al]. Coexistence of Philadelphia chromosome positive cells with and without der(9) deletion in a patient with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genetic and Cytogenetic*, 164(2): 122-127. 2006.
- Yamauchi, K.; Komatsu, T.; Kulkarni, A.D.; [et al]. Glutamine and arginine affect Caco-2cell proliferation by promotion of nucleotide synthesis. *Nutrition*,18:329-333. 2003.
- Yehuda, O.; Abeliovich, D.; Ben-Neriah, S.; [et al]. Clinical implications of fluorescence in situ hybridization analysis in 13 chronic myeloid leukemia cases: Ph negative and variant Ph-positive. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 114:100–107. 1999.
- Zagaria, A.; Anelli, L.; Albano, F.; [et al] .Molecular cytogenetic characterization of deletions on der(9) in chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenetics*, 167(2):97-102. 2006.
- Zhang, Y. y Rowley, J. Chronic Myeloid Leukemia: Current Perspectives. *Clin Lab Med*, 31: 687–698. 2011.
- Zang, S.; Nim, M.; Lian, Y.; [et al]. Expression of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and its role in human hepatocellular carcinoma. *Human Pathology*, 44: 1681–1687. 2013.

Anexos

Protocolo 1. Cultivo de médula ósea (MO).

Materiales

- Tubos cónicos estériles de 15 ml.
- Medio de cultivo [Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, 25 mM de Ácido Hidroxi-Etil Piperazin-Etano-Sulfónico (HEPES), L-Glutamina (Gibco) suplementado con 15% Suero Fetal Bovino (Gibco) y 1% de solución de antibióticos y antifúngicos (Penicilina, Estreptomina, Anfotericina B y Fungizona) (Gibco)].
- Estufa de cultivo.

Método

1. Realizar conteo de células con hemocitómetro de Newbauer (protocolo 2).
2. Sembrar en 10 ml de medio de cultivo ajustando la concentración final de células a 10^6 /ml por cultivo.
3. Incubar a 37 °C durante 24 horas.
4. Cosechar según Protocolo 3.

Protocolo 2. Conteo de células con hemocitómetro de Newbauer.

Materiales

- Hemocitómetro de Newbauer.
- Solución de Turk.
- Medio de cultivo [RPMI 1640, 25 mM HEPES, L-Glutamina (Gibco) suplementado con 15% Suero Fetal Bovino (Gibco) y 1% de solución de antibióticos y antifúngicos (Penicilina, Estreptomina, Anfotericina B y Fungizona) (Gibco)].
- Tubos cónicos estériles de 15 ml.

Método

1. Agregar la muestra de MO a un tubo con medio de cultivo en condiciones de esterilidad. Completar con medio de cultivo hasta alcanzar un volumen de 10 ml.
2. Tomar 20 μ l y colocarlos con 380 μ l de solución de Turk (dilución 1/20), tomar 20 μ l colocarlos en el hemocitómetro.
3. Contar las células en dos cuadrantes opuestos.
4. Dividir este total por dos para obtener el número promedio de células por cuadrante. Multiplicar este número por 10^3 para obtener una estimación del número de células/ml de la muestra de MO.

Protocolo 3. Cosecha de cultivos de médula ósea.

Materiales

- Solución Colcemid KaryoMax 10 μ g/ml (Gibco).
- Solución Hipotónica de Cloruro de Potasio (KCl) 0,075 M (5,6 g de KCl en 1000 ml de H₂O destilada, H₂O_d). La solución debe conservarse en estufa a 37° C.
- Fijador Farmer (3:1 de alcohol metílico/ ácido acético glacial). El fijador debe prepararse en momentos previos a ser usado, no debe ser conservado por más de 3 horas.
- Centrífuga.
- Portaobjetos

Método

- 1) Añadir 0.1 ml de Colcemid al cultivo (concentración final de 0.1 μ g/ml).
- 2) Incubar durante 30 min (minutos) a 37° C.
- 3) Centrifugar 10 min a 800 RPM (revoluciones por minuto).
- 4) Descartar el sobrenadante. Resuspender el *pellet* en 9 ml de solución hipotónica e incubar durante 40 min a 37° C.
- 5) Añadir 5 gotas de fijador Farmer mezclar bien.

- 6) Centrifugar 10 min a 800 RPM.
- 7) Descartar el sobrenadante. Agregar suavemente 7 ml de fijador y resuspender el *pellet*.
- 8) Fijar durante 30 min en freezer a -20°C.
- 9) Centrifugar 10 min a 800 RPM.
- 10) Descartar el sobrenadante y agregar 6 ml de fijador.
- 11) Centrifugar 10 min a 800 RPM.
- 12) Repetir los lavados tres veces más.
- 13) Descartar el sobrenadante. Resuspender el *pellet* en 2 ml de fijador y realizar el goteo sobre un portaobjetos limpio y desengrasado para verificar la presencia de células en metafase.
- 14) Gotear de 6 a 8 portaobjetos, etiquetar y envejecer 1 semana en estufa a 37°C.

Protocolo 4. Lavado de sangre periférica (SP) con *buffer* RCLB (*red cell lysis buffer*) y homogenización para la obtención de *pellet* de glóbulos blancos.

Materiales

- Tubos cónicos de 15 ml estériles.
- Micropipeta P1000.
- Microtubos estériles de 1,5 ml.
- Solución *buffer* de lisis RCLB estéril: 10 ml de TRIS/HCl 1M, (pH 7,6) + 5 ml Cl₂Mg 1M + 2 ml de Cl₂Na 5M + 983 ml de H₂O_d. Esterilizar en autoclave y almacenar a 4°C.
- Homogeneizador circular Bioelec®.
- Centrífuga y microcentrífuga.
- Trizol (TRIZOL® RNA Isolation Reagents, Life Technology) (en caso de posterior extracción de ARN).
- ADNzol (DNAzol® Reagent, Life Technology) (en caso de posterior extracción de ADN).

Método

1. Tomar 5 ml de SP y colocar en tubo cónico estéril. Llevar a volumen de 13 ml con *buffer* RCLB.
2. Homogeneizar durante 10 min lentamente en homogeneizador circular.
3. Centrifugar a 3500 RPM por 10 min.
4. Eliminar por volcado el sobrenadante.
5. Agregar al *pellet* 1 ml de *buffer* RCLB y homogeneizar con micropipeta P1000 hasta disolución.
6. Llevar a volumen de 13 ml con *buffer* RCLB.
7. Repetir pasos: 2, 3, 4 y 5 una vez más.
8. Trasvasar el *pellet* disuelto a microtubo de 1,5 ml
9. Centrifugar a 3500 RPM durante 10 min.
10. Descartar sobrenadante.
11. Agregar 1 ml de Trizol (TRIZOL® RNA Isolation Reagents, Life Technology) para los casos en los que se realice extracción de ARN, disolver el *pellet* de células blancas, dejar estabilizar a TA (temperatura ambiente, 15-30°C) durante 20 min y congelar la muestra a -20°C hasta el momento de la extracción. El material puede mantenerse por hasta tres meses en estas condiciones.
12. Agregar 1 ml DNAzol (DNAzol® Reagent, Life Technology) para los casos en los que se realice extracción de ADN. Disolver el *pellet* de células blancas, dejar estabilizar a TA y congelar a -20°C hasta el momento de la extracción de ADN. El material puede mantenerse en estas condiciones hasta un mes. Como alternativa y ante la carencia de ADNzol o el empleo de técnicas alternativas de extracción, directamente congelar el *pellet* de células blancas a -20°C hasta el momento de la extracción. El material puede conservarse hasta 2 semanas en

estas condiciones. Para almacenamientos más prolongados, congelar el *pellet* de blancos a -80°C .

Protocolo 5. Extracción de ARN con Trizol.

Materiales

- Micropipetas: P1000, P200
- Microtubos estériles de 1,5 ml.
- Cloroformo.
- Alcohol etílico (EtOH) al 75%
- H₂O ultra-pura.
- Vórtex.

Método

1. Agregar 200 μl de cloroformo.
2. Homogeneizar durante 10-15 segundos (seg) agitando suavemente.
3. Dejar 2-3 min a TA (hasta separación de las fases).
4. Centrifugar a 12000 RPM durante 15 min a 4°C .
5. Recuperar la fase acuosa en un nuevo tubo de 1,5 ml dejando una mínima cantidad en el tubo con Trizol para evitar tocar la interfase (aproximadamente 400 μl).
6. Agregar 500 μl de isopropanol.
7. Mezclar las fases agitando suavemente.
8. Centrifugar a 12000 RPM por 10 min a 4°C .
9. Eliminar el sobrenadante volcando el tubo cuidando de que no caiga el *pellet*.
10. Dejar el microtubo boca abajo secando sobre una servilleta por 5 min. Se pueden dar golpes suaves para ayudar a escurrir el sobrenadante.
11. Agregar 1 ml de EtOH 75%.
12. Agitar con vortex para suspender el *pellet*.
13. Almacenar en freezer a -20°C por 12 horas.
14. Centrifugar a 3000 RPM. Eliminar el sobrenadante por volcado del micro-tubo con cuidado de no eliminar el *pellet*. Dejar secar a TA hasta evaporar cualquier resto de EtOH.
15. Agregar 50 μl H₂O ultra-pura.
16. Guardar en freezer a -20°C si va a ser empleado dentro de los 30 días de realizada la extracción. Para periodos más extensos, almacenar a -80°C .

Protocolo 6. Cuantificación espectrofotométrica de ácidos nucleicos.

Materiales

- Espectrofotómetro GeneQuant pro.
- Micropipeta P100
- Microtubos estériles de 0,5 ml.
- H₂O

Método

1. Realizar diluciones 1/40 (ARN) o 1/100 (ADN) del material a medir.
2. Realizar medidas en espectrofotómetro GeneQuant pro a 260nm, 230 nm y 280nm de longitud de onda.
3. Valorar la pureza de las muestras mediante las relaciones DO 260/230 y DO 260/280.
Si la relación $\text{DO } 260/230 < 1$; indica que la muestra está contaminada con solventes orgánicos (e.g., fenol).
Si la relación $\text{DO } 260/280 < 1,8$; indica que la muestra está contaminada con proteínas.
Si la relación $\text{DO } 260/280 \geq 1,8$, la muestra es pura y puede calcularse la concentración de ácidos nucleicos teniendo en cuenta la relación: 1 unidad de $\text{DO}_{260} = 40\mu\text{g ac. nucleicos/ml}$.

Protocolo 7. Extracción de ADN genómico con DNAzol.

Materiales

- Micropipetas: P1000, P200.
- Microtubos estériles de 1,5 ml.
- EtOH al 75% y al 100%.
- Hidroxido de sodio (NaOH) 8 mM: Pesar 40 g de NaOH y disolver en 1000 ml de H₂O, autoclavar la solución y guardar como solución madre. Para 500 ml de NaOH 8 mM, tomar 4 ml de la solución madre y agregar 496 ml de H₂O.

Método

- 1- Agregar 500µl de EtOH 100%.
- 2- Mezclar por inversión y dejar reposar 1-3 min a TA. El ADN se hará visible como un ovillo (precipitado) turbio. Sacar el ADN precipitado recogiendo en un cono amarillo o *tip* (o capilar) y llevarlo a un nuevo microtubo de 1,5 ml. Cuando la cantidad de ADN es pequeña (<15 µg) y no forma precipitado al agregar el EtOH, centrifugar a 4000 RPM a TA durante 2 min para sedimentar el ADN, visible o no, y descartar el sobrenadante.
- 3- Lavar 2 veces el ADN en 1 ml de EtOH al 75% invirtiendo el tubo 3-5 veces. Eliminar el EtOH con micropipeta. En los casos de cantidades menores a 15 µg, centrifugar a 4000 RPM a TA durante 2 min y eliminar el EtOH por volcado.
- 4- Dejar secar el ADN a TA por 60 seg. Evitar tiempos de secado mayores, ya que una prolongada exposición al aire hará más difícil disolver el ADN.
- 5- Disolver el ADN 300µl de NaOH 8 mM. En el caso de cantidades pequeñas de ADN, usar 100 µl de NaOH. Dejar reposando toda la noche a 37° C para una buena disolución.
- 6- Guardar en heladera a 4°C. Para guardados prolongados (meses), almacenar a -20° C.

Protocolo 8. Extracción de ADN genómico con fenol-cloroformo.

Materiales

- Solución de proteinasa K (Promega): 200 µl de *buffer* (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM de CaCl) + 25 µl de proteinasa K.
- Fenol (equilibrada con 10 mM Tris/HCl, (pH 8.0), SIGMA).
- Microtubos de 1,5 ml.
- Alcohol Isoamílico-Cloroformo (IAC): es una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 24:1. Preparar 6 ml de cloroformo + 0,25 ml de alcohol isoamílico.
- H₂O.

Método

1. Agregar 225 µl de solución de proteinasa K al *pellet* de leucocitos e incubar a 37°C durante toda la noche.
2. Agregar 1 volumen de Fenol/Tris/HCl (aproximadamente 500 µl), agitar durante 10 seg y centrifugar a 13000 RPM durante 5 min.
3. Trasvasar la fase acuosa (superior) a un nuevo microtubo y descartar la fase orgánica (inferior).
4. Agregar 1 volumen (aproximadamente 450 µl) de Fenol/IAC (1:1), homogenizar y centrifugar a 13000 RPM durante 5 min.
5. Trasvasar la fase acuosa (superior) a un nuevo microtubo y descartar la fase inferior.
6. Agregar 1 volumen (aproximadamente 450 µl) de IAC, homogenizar y centrifugar a 13000 RPM durante 5 min. Trasvasar y conservar la fase acuosa (superior). Descartar la fase orgánica.

7. Agregar 1/10 volumen de cloruro de sodio (NaCl) 3 M (aproximadamente 45 μ l) y mezclar durante 30 seg.
8. Agregar 1,5 volúmenes de EtOH absoluto frío (aproximadamente 750 μ l) y agitar por inversión.
9. El ADN se hará visible como un ovillo (precipitado) turbio. Sacar el ADN precipitado recogiendo en un cono amarillo o *tip* (o capilar) y llevarlo a un nuevo microtubo de 1,5 ml. Lavar en EtOH al 70%, dejar secar a TA. Agregar 100-300 μ l de H₂O ultra pura. Si no se forma ovillo de ADN con el agregado de EtOH, incubar en freezer a -20°C durante 12 horas y centrifugar a 13000 RPM durante 10 min. Retirar el sobrenadante y agregar 350 μ l de EtOH 70%. Centrifugar a 13000 RPM durante 10 min, descartar el sobrenadante (volcando el microtubo). Secar en placa térmica o en estufa a 37°C y resuspender en 50 μ l de TE o H₂O_d.
10. Hidratar toda la noche a TA o ½ hora a 60°C y guardar en freezer a -20°C.

Protocolo 9. Bando G.

Materiales

- *Buffer* Salino de Fosfato (PBS): KH₂PO₄ (fosfato monopotásico) 0,025 M (3,4 g de KH₂PO₄ en 1000 ml de H₂O_d).
- Solución de tripsina al 1% (1 g de tripsina 1:250 (Gibco) en 100 ml de H₂O_d). Disolver la tripsina y colocar la solución en agitador magnético durante una hora a TA. Filtrar, fraccionar en tubos de 1,5 ml y congelar hasta el momento de usar.
- Solución fisiológica (9 g de NaCl en 1000 ml de H₂O_d). Solución de trabajo: en una jarra *coplin* colocar 20 ml de solución fisiológica, 20 ml de PBS y un vial de 1,5 ml de solución de tripsina al 1%.
- Colorante Giemsa (5 ml de Giemsa (Biopur) en 40 ml de H₂O_d).
- Tres jarras *coplin*.
- Microscopio óptico con objetivos 10X, 40X y 100X.
- Aceite de inmersión.

Método

- 1) Sumergir los extendidos en solución de Tripsina (0,1 %) durante 5-10 seg.
- 2) Enjuagar los extendidos en solución fisiológica.
- 3) Teñir en solución de Giemsa durante 5 min.
- 4) Limpiar en agua corriente y dejar secar.
- 5) Analizar en microscopio óptico.

Protocolo 10. Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

Materiales

- Baño termostático.
- Seis jarras *coplin*.
- Cámara húmeda opaca.
- Cubre-objetos de 20 mm.
- Microscopio óptico de fluorescencia con filtros de emisión-excitación: verde (excitación a 495 nm y emisión a 519 nm), rojo (excitación a 550 nm y emisión a 570 nm) y DAPI (excitación a 350 nm y emisión a 470 nm).
- Micropipetas: P2, P10, P100 y P1000.
- Estufa de cultivo.
- Termómetro.
- Solución salina de citrato 20X (SSC): pesar 88,24 g de citrato de sodio (Na₃C₆H₅O₇, concentración final 300 mM), 175,3 g de NaCl (concentración final 3 M) y completar con H₂O_d hasta alcanzar 1 L. Ajustar a pH 7 con ácido clorhídrico (HCl) 1 N.

- 2X SSC: 100 ml de 20X SSC + 900 ml de H₂O.
- Solución de formamida al 70% en 2X SSC: 35 ml de formamida + 15 ml de 2X SSC. Esta solución puede usarse durante una semana. Guardar en jarra *coplin* a 4°C.
- Soluciones de EtOH al 70%, 90% y 100%. EtOH 70%: 56ml de EtOH + 24 ml de H₂O. EtOH 90%: 72 ml de EtOH + 8 ml de H₂O.
- Solución de sonda *BCR/ABL1* fluorescente doble color/doble fusión (LIVE Probes, Lexel *In Vitro*).
- Solución de sonda *BCR/ABL1* fluorescente doble color/doble fusión (Cytocell Aquarius probes)
- Detergente no-iónico Tween 20 o NP40.
- Cemento de contacto removible.
- Solución de lavado 1: 16 ml de 2X SSC (concentración final 0,4X SSC) + 64 ml de H₂O + 240 µl de detergente no-iónico.
- Solución de lavado 2: 80 ml de 2X SSC + 80 µl de detergente no-iónico.
- Solución contracolorante DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol) diluido en antifade: 2 mg de DAPI en 1 ml de H₂O ultra-pura (concentración final 2 mg/ml), solución madre. Diluir 10 µl de la madre en 990 µl de H₂O ultra-pura (concentración final 20 µg/ml), solución de stock. Para la solución de trabajo: 5 µl de la solución de stock en 995 µl de antifade (concentración final 0,1 µg/ml).
- Aceite de inmersión.
- Microtubos de 0,5 ml limpios.

Método

1. Sobre portaobjetos limpios y desengrasados, gotear la fijación citogenética (en la medida de lo posible los extendidos deben estar limpios y sin resto de citoplasma).
2. Marcar las regiones a hibridar con lápiz para vidrio.
3. Sumergir los preparados en formamida 70% (en 2x SSC pH 7) a 72°C durante 3-5 min. El tiempo de desnaturalización se calcula respecto de la vejez del vidrio goteado. Tres min para extendidos del mismo día. Cinco min para extendidos mantenidos a -20°C.
4. Enjugar el preparado brevemente en EtOH 70% agitando suavemente para quitar la formamida.
5. Deshidratar en serie de alcoholes de concentración creciente (70%, 90% y 100% durante 2 min en cada uno).
6. Dejar secar a TA.
7. En un tubo de 0,5 ml mezclar 1 µl de sonda *BCR/ABL* (Live-Lexel) + 5µl de *buffer* de hibridación.
8. Desnaturalizar la solución de sonda durante 10 min. a 72°C. Posteriormente enfriar bruscamente a -20°C.
9. Realizar un *spin* breve para concentrar la sonda y poner la solución sobre la región a hibridar.
10. Cubrir con un cubreobjetos de tamaño adecuado que abarque toda la región a hibridar y sellar los bordes con cemento de contacto removible para evitar la evaporación de los componentes acuosos del *buffer* de hibridación.
11. Colocar el extendido en cámara húmeda opaca e incubar a 37°C durante 12 horas.
12. Retirar cuidadosamente el cemento de contacto de los bordes del cubreobjetos.
13. Quitar los cubreobjetos cuidando de no arrastrarlo sobre la zona hibridada. Esto puede hacerse mecánicamente o bien sumergiéndolo en solución de 2X SSC a TA durante algunos minutos.
14. Calentar la solución de lavado 1 a 65° C.

15. Sumergir el extendido en la solución de lavado 1 durante un min. Este lavado tiene como objeto remover la sonda que haya hibridado inespecíficamente.
16. Sumergir en solución de lavado 2 durante dos min a TA.
17. Escurrir suavemente el portaobjetos.
18. Agregar 20 µl de solución de contra-colorante DAPI.
19. Cubrir con un cubreobjetos de tamaño adecuado que abarque totalmente la región hibridada.
20. Eliminar el exceso de contracolorante presionando suavemente el vidrio montado entre hojas de papel secante.
21. Realizar la observación del extendido en microscopio de fluorescencia. Los extendidos pueden conservarse por dos meses a -20°C.

Protocolo 11. Retrotranscripción.

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- Enzima MMLV (Promega Corp. #M1705, USA)
- *Random Primers* (Biodynamics SRL #B070-40, ARG).
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101)
- 1000 ng de ARN total.

Método

Desnaturalización del ARN

1. Emplear 1000 ng totales de ARN como material de partida en un volumen de 10µl de agua libre de nucleasas.
2. Desnaturalizar el ARN a 94°C en ciclador durante 8 min. Finalizada la desnaturalización, mantener a 4°C.

Retrotranscripción

3. Preparar mix de reacción para un volumen final de 20µl (10µl de muestra + µl de mix de reacción) con:

- <i>Buffer</i> (Promega Corp.#M1705) [5X]	_____	4 µl
- <i>Random primer</i> (Biodynamics SRL #B070-40)[dilución 1/8]	_____	1 µl
- dNTPs [10 mM]**	_____	2 µl
- H ₂ O (libre de nucleasas)	_____	2 µl
- Enzima (MMLV-RT) [200 U/µl]	_____	1 µl
- Volumen final mix de reacción	_____	10 µl

Volumen Final: ARN desnaturalizado (Templado) 10 µl + Mix de reacción 10 µl = 20 µl

La retrotranscripción consta de un programa con 4 etapas:

- 1ª etapa: 25°C durante 5 min (estabilización)
- 2ª etapa: 37°C durante 1 hora (retro-transcripción)
- 3ª etapa: 90°C durante 10 min (inactivación de la enzima y desnaturalización del híbrido ADN-ARN)
- 4ª etapa: 15°C (*holding* final)

El ADNc obtenido debe ser conservado a -20°C.

Protocolo 12. PCR de β -Actina I

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Invitrogen #5288688, USA)**.

- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101)
- ADNc: 2 µl del ADNc (protocolo 11).

** *Primer B-Actina I Forward*: ATGTTTGAGACCTTCAACACCCC
Primer B-Actina I Reverse: GCCATCTCTTGCTCGAAGTCCAG

Método

- H ₂ O _____	16 µl
- <i>Buffer GoTaq</i> [5X] _____	5 µl
- dNTPs [10 mM] _____	0,6 µl
- <i>Primer B-Actina I Forward</i> [10 µM] _____	0,6 µl
- <i>Primer B-Actina I Reverse</i> [10 µM] _____	0,6 µl
- Taq [500 U/µl] _____	0,2 µl
- ADNc _____	2 µl
- Volumen Final _____	25 µl

Ciclado

95°C 5 min (Desnaturalización)	} 35 ciclos
95°C 30 seg (Desnaturalización)	
60°C 30 seg (<i>Annealing</i>)	
72°C 45 seg (Elongación o extensión)	
72°C 10 min (Elongación o extensión final)	
15°C ∞	

Producto esperado: 319pb

Protocolo 13. PCR *nested* de *BCR/ABL1m* (p210)

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Invitrogen #5233180, USA)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNc: 2 µl del ADNc (protocolo 11).

** *Primer Forward BCR e13-A*: GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTC (1° round)
Primer Reverse ABL a3-B: GTTTGGGCTTCACACCATTCC (1° round)
Primer Forward BCR e13-C: CAGATGCTGACCAACTCGTGT (2° round)
Primer Reverse ABL a3-D: TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA (2° round)

Método

- 1° round

- H ₂ O _____	14,8 µl
- <i>Buffer GoTaq</i> [5X] _____	5 µl
- dNTPs [10 mM] _____	0,6 µl
- <i>Primer BCR e13-A</i> [10 µM] _____	1,25 µl
- <i>Primer ABL a3-B</i> [10 µM] _____	1,25 µl
- Taq [500 U/µl] _____	0,2µl
- ADNc _____	2 µl
- Volumen Final _____	25 µl

Ciclado

94°C	3 min (Desnaturalización)	} 35 ciclos
94°C	30 seg (Desnaturalización)	
65°C	45 seg (<i>Annealing</i>)	
72°C	60 seg (Elongación o extensión)	
72°C	10 min (Elongación o extensión final)	
15°C	∞	

Producto esperado: 417 pb (isoforma b3-a2) o 345 pb (isoforma b2-a2).

- 2° round

Tomar 1 µl de producto del 1° round y realizar una re-amplificación utilizando las mismas condiciones de reacción empleadas en el 1° round (mismo volumen, mismas concentraciones y mismo ciclado) pero con los *primers*: BCR e13-C y ABL a3-D.

Producto esperado: 360 pb (isoforma b3-a2) o 285 pb (isoforma b2-a2).

Protocolo 14. PCR *nested* de ABL1/BCRm

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Invitrogen #5251881, USA)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNc: 2 µl del ADNc (protocolo 11).

- ** *Primer Forward* ABL 1b externo: GTGGAGATGCAGCGAATGTGAAAT (1° round)
Primer Reverse BCR e18: CTCTCGGTCAAGTTCAACAGCAGG (1° round)
Primer Forward ABL 1b: TACTTGGGGACCAAAGAAGG (2° round)
Primer Reverse b4/e15: CAGCTGTGTCCCTGTAGACG (2° round)

Método

- 1° round

H ₂ O	_____	14,8 µl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]	_____	5 µl
dNTPs [10 mM]	_____	0,6 µl
<i>Primer</i> ABL 1b externo [10 µM]	_____	1,25 µl
<i>Primer</i> BCR e18 [10 µM]	_____	1,25 µl
<i>GoTaq</i> [500 U/µl]	_____	0,2 µl
ADNc	_____	2 µl
Volumen Final	_____	25 µl

Ciclado

94°C	3 min (Desnaturalización)	} 35 ciclos
94°C	30 seg (Desnaturalización)	
58°C	45 seg (<i>Annealing</i>)	
72°C	60 seg (Elongación o extensión)	
72°C	10 min (Elongación o extensión final)	
15°C	∞	

Producto esperado: 659 pb (isoforma b1-b3) o 575 pb (isoforma b1-b4).

- 2° round

Tomar 1 µl de producto y realizar una re-amplificación.

H ₂ O	13,05 µl
Buffer GoTaq [5X]	7,5 µl
dNTPs [10 mM]	1,25 µl
Primer ABL 1b externo [10 µM]	1 µl
Primer BCR e18 [10 µM]	1 µl
GoTaq [500 U/µl]	0,2 µl
ADNc	1 µl
Volumen Final	25µl

Ciclado

94°C	5 min (Desnaturalización)	} 35 ciclos
94°C	50 seg (Desnaturalización)	
55°C	45 seg (<i>Annealing</i>)	
72°C	60 seg (Elongación o extensión)	
72°C	10 min (Elongación o extensión final)	
15°C	∞	

Producto esperado: 270 pb (isoforma b1-b3) o 195 pb (isoforma b1-b4).

Protocolo 15. qRT-PCR *BCR/ABL1*

Materiales

- Ciclador Rotor Gene Q (Qiagen)
- kit Molecular MD (*MolecularMD® One-Step qRT-PCR BCR-ABL kit*)
- H₂O *Rnase-Free*
- 2X *Reaction Mix Buffer* (0,4 mM c/dNTPs) (Thermo Fisher Scientific Inc.)
- SuperScript® III *RT/Platinum Taq Mix* (Thermo Fisher Scientific Inc.)
- ROX (25 µM)
- ARN: 5 µl de ARN (0,2 µg/µl) (protocolo 5).

Método

H ₂ O	3,7 µl
Buffer 2X RM [0,4 mM c/dNTPs]	10 µl
Primer Set <i>Molecular MD</i> (primers + sonda <i>taqman</i>)	0,8 µl
ROX [25 µM]	0,1 µl
Taq SS III	0,4 µl
ARN	5 µl
Volumen Final	20µl

Ciclado

94°C	3 min	(Desnaturalización inicial)
50°C	15 min	} 1 ciclo (generación de ADNc)
95°C	2 min	
95°C	15 seg	} 45 ciclos (amplificación)
60°C	60 seg	

Protocolo 16. qRT-PCR *ASS1*

Materiales

- Ciclador Rotor Gene Q (Qiagen)
- Agua libre de nucleasas.

- Mezcla real 2X (Biodinamics® #B124-100).
- *Primers* específicos (Invitrogen #5308691, USA)**.
- ADNc: 2 µl del ADNc (protocolo 11).

** *Primer Forward ASS1*: GGCCGGCCATCCAGTCC
Primer Reverse ASS1: GGCCCTTGAACCGGTTGTAG

Método

H ₂ O	6,5 µl
<i>Primer Forward ASS1</i> [10 µM]	0,75 µl
<i>Primer Reverse ASS1</i> [10 µM]	0,75 µl
Mezcla Real [2X]	10 µl
ADNc	2 µl
Volumen Final	20µl

Ciclado

95°C	5 min	(Desnaturalización inicial)	} 40
95°C	30 seg	(Desnaturalización)	
60°C	45 seg	(<i>Annealing</i> y Elongación)	
50°C	30 seg	(<i>Holding</i> final)	

Producto esperado: 249 pb.

Protocolo 17. qRT-PCR *SMARCB1*

Materiales

- Ciclador Rotor Gene Q (Qiagen)
- Agua libre de nucleasas.
- Mezcla real 2X (Biodinamics® #B124-100).
- *Primers* específicos (Invitrogen #5308691, USA)**.
- ADNc: 2 µl del ADNc (protocolo 11).

** *Primer Forward SMARCB1*: TCACTCTGGAGGCGACTA
Primer Reverse SMARCB1: GGGGGCTCTGTGCTGATG

Método

H ₂ O	6,5 µl
<i>Primer Forward SMARCB1</i> [10 µM]	0,75 µl
<i>Primer Reverse SMARCB1</i> [10 µM]	0,75 µl
Mezcla Real [2X]	10 µl
ADNc	2 µl
Volumen Final	20µl

Ciclado

95°C	5 min	(Desnaturalización inicial)	} 45
95°C	25 seg	(Desnaturalización)	
60°C	25 seg	(<i>Annealing</i>)	
72°C	45 seg	(Elongación)	
50°C	30 seg	(<i>Holding</i> final)	

Producto esperado: 312 pb.

Protocolo 18. qRT-PCR *PTGES*

Materiales

- Ciclador Rotor Gene Q (Qiagen)
- Agua libre de nucleasas.
- Mezcla real 2X (Biodinamics® #B124-100).
- *Primers* específicos (Invitrogen #5308691, USA)**.
- ADNc: 2 µl del ADNc (protocolo 11).

** *Primer Forward PTGES*: GAGACACGGAGGCCCCAGTATTG
Primer Reverse PTGES: CACACGGCCACGAGGAAGACC

Método

H ₂ O	6,5 µl
<i>Primer Forward PTGES</i> [10 µM]	0,75 µl
<i>Primer Reverse PTGES</i> [10 µM]	0,75 µl
Mezcla Real [2X]	10 µl
ADNc	2 µl
Volumen Final	20 µl

Ciclado

95°C	5 min	(Desnaturalización inicial)	} 45
95°C	20 seg	(Desnaturalización)	
60°C	20 seg	(<i>Annealing</i>)	
72°C	45 seg	(Elongación)	
50°C	30 seg	(<i>Hold</i> ing final)	

Producto esperado: 286 pb.

Protocolo 19. qRT-PCR β -Actina I

Materiales

- Ciclador Rotor Gene Q (Qiagen)
- Agua libre de nucleasas.
- Mezcla real 2X (Biodinamics® #B124-100).
- *Primers* específicos (Invitrogen #5288688, USA)**.
- ADNc: 2 µl del ADNc (protocolo 11).

** *Primer Forward β -Actina I*: ATGTTTGAGACCTTCAACACCCC
Primer Reverse β -Actina I: GCCATCTCTTGCTCGAAGTCCAG

Método

H ₂ O	5 µl
<i>Primer Forward β-Actina I</i> [10 µM]	1,5 µl
<i>Primer Reverse β-Actina I</i> [10 µM]	1,5 µl
Mezcla Real [2X]	10 µl
ADNc	2 µl
Volumen Final	20 µl

Ciclado

95°C	5 min	(Desnaturalización inicial)	} 45
95°C	20 seg	(Desnaturalización)	
60°C	30 seg	(<i>Annealing</i>)	
72°C	45 seg	(Elongación)	
50°C	30 seg	(<i>Hold</i> ing final)	

Producto esperado: 317 pb.

Protocolo 20. Digestión de ADN genómico con *Bcl-I*

Materiales

- Baño termostático o ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- Enzima *Bcl-I* + *Buffer G* (Fermentas #ER0721).
- ADN genómico (ADNg): 20 μ l [100 ng/ μ l] (protocolo 7 u 8)

Método

H ₂ O	_____	24 μ l
<i>Buffer G</i> [10X]	_____	5 μ l
<i>Bcl-I</i> [10 U/ μ l]	_____	1 μ l
ADNg [100 ng/ μ l]	_____	20 μ l
Volumen Final	_____	50 μl

Ciclado

55°C 16 horas (digestión)

Protocolo 21. Purificación de los fragmentos de restricción de ADN digeridos con *Bcl-I*.

Materiales

- Microcentrífuga.
- Microtubos de 1,5 ml.
- Fenol (equilibrado con 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, SIGMA).
- IAC: 6 ml de cloroformo + 0,25 ml de alcohol isoamílico.
- Solución de NaCl [3 M].
- EtOH absoluto.
- H₂O estéril.

Método

1. Trasvasar los 50 μ l de la solución de ADN digerido a un microtubo de 1,5 ml y añadir 100 μ l de H₂O estéril a la muestra para completar un volumen de 150 μ l.
2. Añadir 1 volumen (150 μ l) de Fenol/IAC (1:1), mezclar gentilmente y centrifugar a 13000 RPM por 5 min. La enzima *Bcl-I* no puede ser inactivada mediante calor, por lo que su inactivación debe ser alcanzada con tratamiento con fenol-cloroformo. Este paso no puede ser reemplazado con la utilización de columnas de purificación.
3. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml y agregar un volumen de IAC, homogeneizar y centrifugar a 13000 RPM durante 5 min.
4. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml (evitar llevar en el traspaso cloroformo con la fase acuosa, ya que este inhibe la reacción de ligación con enzima *ligasa T4*). Medir el volumen de la fase acuosa trasvasado (aproximadamente 140 μ l).
5. Precipitar el ADN con 1/10 volumen de NaCl 3 M (aproximadamente 14 μ l) y dos volúmenes de EtOH absoluto frío (aproximadamente 300 μ l). Un exceso de NaCl puede agregar inhibidores al *pellet* de ADN que puede obstaculizar el paso siguiente de ligación con enzima *ligasa T4*
6. Incubar 2 horas a -20°C.
7. Centrifugar 10 min a 16000 RPM. Volcar el sobrenadante y dejar secar a TA. Usualmente el *pellet* de ADN no es visible.
8. Resuspender en 50 μ l de H₂O estéril y conservar a 4°C.

Protocolo 22. Circularización de ADN digerido.

Materiales

- Ciclador

- Agua libre de nucleasas.
- Enzima T4 DNA *Ligase* + T4 DNA *Ligase Buffer* (Fermentas #EL0014).
- ADN digerido (protocolo 21)

Método

H ₂ O	_____	307 µl
Buffer T4 DNA <i>Ligase</i> [10X]	_____	40 µl
T4 DNA <i>Ligase</i> [5 U/µl]	_____	3 µl
ADN digerido	_____	50 µl
Volumen Final	_____	400 µl

Ciclado

15°C 15 horas (ligación)

El empleo de grandes volúmenes favorece la auto-ligación de la molécula lineal de ADN sobre los dos puntos de corte de *Bcl-I*, resultando en un aumento de la tasa de formación de ADN circular respecto del ADN lineal.

Protocolo 23. Purificación del ADN circularizado.

Materiales

- Microcentrífuga.
- Microtubos de 1,5 ml.
- Fenol (equilibrada con 10 mM Tris/HCl, (pH 8.0), SIGMA).
- IAC: Preparar 6 ml de cloroformo + 0,25 ml de alcohol isoamílico.
- Solución de NaCl [3M].
- EtOH absoluto.
- H₂O estéril.

Método

1. Trasvasar los 400 µl de la solución de ADN circularizado a un microtubo de 1,5 ml y añadir 1 volumen de Fenol/IAC (1:1), mezclar gentilmente y centrifugar a 13000 RPM por 5 min.
2. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml y agregar un volumen de IAC, homogeneizar y centrifugar a 13000 RPM durante 5 min.
3. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml (ser cuidadoso y evitar el traspaso cloroformo con la fase acuosa, ya que este inhibe la reacción de PCR). Medir el volumen de la fase acuosa traspasado (aproximadamente 350 µl).
4. Precipitar el ADN con 1/10 volumen de NaCl 3M (aproximadamente 35 µl) y dos volúmenes de EtOH absoluto frío (aproximadamente 800 µl).
5. Incubar 2 horas a -20°C.
6. Centrifugar 15 min a 13000 RPM. Volcar el sobrenadante y dejar secar a TA. Usualmente el *pellet* de ADN no es visible.
7. Resuspender en 40 µl de H₂O estéril y conservar a 4°C.

Alternativa: la extracción de ADN circular puede realizarse a través de un kit de extracción usando columnas de purificación (e.g. *Spin GFX PCR DNA and gel Band Purification Kit* (GEHealthcare) o similar).

Protocolo 24. I-LD-PCR de *BCR/ABL1* genómico.

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.

- Expand Long Template *Buffer* 1 (Roche, #11681842001)
- Expand Long Template PCR System (Roche, #11681842001)
- *Primers* específicos (Invitrogen #5237567, USA)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADN circularizado: 5 µl (protocolo 23).

** *Primer Forward* B1: TACTCCAAGCCCTCCACTGTC
Primer Reverse A1: GGGCCACACCTCACTCTG

Método

H ₂ O	8,2 µl
Expand Long Template <i>Buffer</i> 1 [10X]	2,5 µl
dNTPs [10 mM]	5 µl
<i>Primer</i> B1 [10 µM]	2 µl
<i>Primer</i> A1 [10 µM]	2 µl
Expand Long system [500 U/µl]	0,3 µl
ADN circularizado	5 µl
Volumen Final	25 µl

Ciclado

94°C	1 min	(Desnaturalización inicial)	
94°C	1 min	(Desnaturalización 1° ciclo)	}
58°C	30 seg	(<i>Annealing</i> 1° ciclo)	
68°C	7 min	(Elongación o extensión 1 ciclo)	
94°C	1 min	(Desnaturalización 2° ciclo)	}
58°C	7 min	(<i>Annealing</i> 2° ciclo)	
68°C	7 min + 20 seg	en cada ciclo (Elongación o extensión 2 ciclo)	
68°C	10 min	(Elongación o extensión final)	}
15°C	∞		

Producto esperado: *BCR-WT* 4,3 kb. La señal correspondiente a *BCR/ABL1* variará en forma caso específico en función del tamaño del fragmento translocado desde *ABL1*.

Protocolo 25. PCR de control de sitio de restricción *Bcl-I* A en *BCR*.

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Invitrogen #5238157, 5237567 USA)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNg: 4µl [100ng/µl] (protocolo 7 u 8)

** *Primer Forward* control sitio A: ACTGGGCATCTGGGCACAAC
Primer Reverse A1: GGGCCACACCTCACTCTG

Método

H ₂ O	12,7 µl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]	5 µl
dNTPs [10 mM]	0,6 µl
<i>Primer</i> control sitio A [10 µM]	1,25 µl
<i>Primer</i> A1 [10 µM]	1,25 µl
<i>GoTaq</i> [500 U/µl]	0,2 µl

ADNg _____ 4 μ l
Volumen Final _____ **25 μ l**

Ciclado

94°C	3 min	(Desnaturalización)	}	35 ciclos
94°C	60 seg	(Desnaturalización)		
56°C	60 seg	(<i>Annealing</i>)		
72°C	60 seg	(Elongación o extensión)		
72°C	10 min	(Elongación o extensión final)		
15°C	∞			

Producto esperado: 586 pb.

PCR de prueba de control de sitio de restricción *Bcl-I* D

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Invitrogen #5238157, 5237567 USA)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNg: 4 μ l [100 ng/ μ l] (protocolo 7 u 8)

** *Primer Forward* D: GGGCCACACCTCACTCTG
Primer Reverse control sitio D: ATGGATCCCCTGTGGCTCTTAT

Método

H₂O _____ 12,7 μ l
Buffer GoTaq [5X] _____ 5 μ l
dNTPs [10 mM] _____ 0,6 μ l
Primer D [10 μ M] _____ 1,25 μ l
Primer control sitio D [10 μ M] _____ 1,25 μ l
GoTaq [500 U/ μ l] _____ 0,2 μ l
ADNg _____ 4 μ l
Volumen Final _____ **25 μ l**

Ciclado

94°C	3 min	(Desnaturalización)	}	35 ciclos
94°C	60 seg	(Desnaturalización)		
58°C	60 seg	(<i>Annealing</i>)		
72°C	60 seg	(Elongación o extensión)		
72°C	10 min	(Elongación o extensión final)		
15°C	∞			

Producto esperado: 521 pb.

Protocolo 26. PCR inversa (I-PCR) de control de circularización.

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)

- *Primers* específicos (Invitrogen #5308691 USA)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADN circularizado: 4 µl [100 ng/µl] (protocolo 22 y 23)

** *Primer Forward* A1: TACTCCAAGCCCTCCACTGTC
Primer Reverse D2: CAGGCTGCTTGGTCTACAC

Método

H ₂ O	12,7 µl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]	5 µl
dNTPs [10 mM]	0,6 µl
<i>Primer A1</i> [10 µM]	1,25 µl
<i>Primer D2</i> [10 µM]	1,25 µl
<i>GoTaq</i> [500 U/µl]	0,2 µl
ADN circularizado	4 µl
Volumen Final	25 µl

Ciclado

94°C	3 min	(Desnaturalización)	} 30 ciclos
94°C	30 seg	(Desnaturalización)	
56°C	60 seg	(<i>Annealing</i>)	
72°C	60 seg	(Elongación o extensión)	
72°C	5 min	(Elongación o extensión final)	
15°C	∞		

Producto esperado: 340 pb

Protocolo 27. PCR de *BCR/ABL1* y *BCR-WT* caso-específico #1.

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Invitrogen #5308691 USA)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNg: 3 µl [100 ng/µl] (protocolo 7 u 8)

** *Primer Forward* BCR/ABL 5257: GCACTTTGGGAGGCTGAGG
Primer Reverse BCR/ABL 5257: CGAGGGAGGTGGGGGTTGC
Primer Reverse BCR-WT 5257: GGGCCAGGAGAAAGATTATGTTA

Método

H ₂ O	8,7 µl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]	5 µl
dNTPs [10 mM]	0,6 µl
<i>Primer Forward</i> BCR/ABL 5257 [10 µM]	2,5 µl
<i>Primer Reverse</i> BCR/ABL 5257 [10 µM]	2,5 µl
<i>Primer Reverse</i> BCR-WT 5257 [10 µM]	2,5 µl
<i>GoTaq</i> [500 U/µl]	0,2 µl
ADNg	3 µl
Volumen Final	25 µl

Ciclado

94°C	3 min	(Desnaturalización)	}	35 ciclos
94°C	60 seg	(Desnaturalización)		
63°C	45 seg	(<i>Annealing</i>)		
72°C	60 seg	(Elongación o extensión)		
72°C	10 min	(Elongación o extensión final)		
15°C	∞			

Producto esperado *BCR/ABL1*: 562 pb.

Producto esperado *BCR-WT*: 818 pb.

Protocolo 28. PCR de *ABL1/BCR* y *ABL1-WT* caso-específico #1.

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Invitrogen #5308691 USA)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNg: 3µl [100ng/µl] (protocolo 7 u 8)

** *Primer Forward ABL/BCR 5257*: TTATTCCCTCCCCATTCAAAAACAA

Primer Reverse ABL/BCR 5257: ACTGCAACCTCCGCCTCCTG

Primer Reverse ABL-WT 5257: GAACCCAAATGCACCCTGAAAAAT

Método

H ₂ O		8,7 µl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]		5 µl
dNTPs [10 mM]		0,6 µl
<i>Primer Forward ABL/BCR 5257</i> [10 µM]		2,5 µl
<i>Primer Reverse ABL/BCR 5257</i> [10 µM]		2,5 µl
<i>Primer Reverse ABL-WT 5257</i>		2,5 µl
<i>GoTaq</i> [500 U/µl]		0,2 µl
ADNg		3 µl
Volumen Final		25 µl

Ciclado

94°C	3 min	(Desnaturalización)	}	35 ciclos
94°C	60 seg	(Desnaturalización)		
60°C	45 seg	(<i>Annealing</i>)		
72°C	60 seg	(Elongación o extensión)		
72°C	10 min	(Elongación o extensión final)		
15°C	∞			

Producto esperado *ABL1/BCR*: 227 pb.

Producto esperado *ABL1-WT*: 849 pb.

Protocolo 29. PCR de *BCR/ABL1* y *BCR-WT* caso-específico #2.

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Invitrogen #5297764USA)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNg: 3µl [100ng/µl] (protocolo 7 u 8)

** *Primer Forward* BCR/ABL 5329: GGCCCCACTCCCGTCCTC
Primer Reverse BCR/ABL 5329: GTCCCCCTCCCTCAACCAAAA
Primer Reverse BCR-WT 5329: AAGGCATCAACCAGCACAAACACT

Método

H ₂ O	8,7 µl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]	5 µl
dNTPs [10 mM]	0,6 µl
<i>Primer Forward</i> BCR/ABL 5329 [10 µM]	2,5 µl
<i>Primer Reverse</i> BCR/ABL 5329 [10 µM]	2,5 µl
<i>Primer Reverse</i> BCR-WT 5329	2,5 µl
<i>GoTaq</i> [500 U/µl]	0,2 µl
ADNg	3 µl
Volumen Final	25 µl

Ciclado

94°C 3 min (Desnaturalización)	} 35 ciclos
94°C 45 seg (Desnaturalización)	
62°C 30 seg (<i>Annealing</i>)	
72°C 60 seg (Elongación o extensión)	
72°C 10 min (Elongación o extensión final)	
15°C ∞	

Producto esperado *BCR/ABL1*: 416 pb.

Producto esperado *BCR-WT*: 664 pb.

Protocolo 30. PCR de *ABL1/BCR* y *ABL1-WT* caso-específico #2.

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Invitrogen #5293157 USA)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNg: 3µl [100ng/µl] (protocolo 7 u 8)

** *Primer Forward* ABL/BCR 5329: GGCAGCCATCTCTAAGG
Primer Reverse ABL/BCR 5329: TGGGCCAAAACATACTC
Primer Reverse ABL-WT 5329: ATCAGAGGACATGGAGCCC

Método

H ₂ O	8,7 µl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]	5 µl
dNTPs [10 mM]	0,6 µl
<i>Primer Forward</i> ABL/BCR 5329 [10 µM]	2,5 µl
<i>Primer Reverse</i> ABL/BCR 5329 [10 µM]	2,5 µl
<i>Primer Reverse</i> ABL-WT 5329	2,5 µl
<i>GoTaq</i> [500 U/µl]	0,2 µl
ADNg	3 µl
Volumen Final	25 µl

Ciclado

94°C 3 min (Desnaturalización)

94°C	45 seg (Desnaturalización)	} 35 ciclos
53°C	45 seg (<i>Annealing</i>)	
72°C	60 seg (Elongación o extensión)	
72°C	10 min (Elongación o extensión final)	
15°C	∞	

Producto esperado *ABL1/BCR*: 380 pb.
 Producto esperado *ABL-WT*: 830 pb.

Protocolo 31. PCR de *BCR/ABL1* y *BCR-WT* caso-específico #3.

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Genbiotech #7878, ARG)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNg: 3µl [100ng/µl] (protocolo 7 u 8)

** *Primer Forward BCR/ABL 5612*: TGGCCTCCTCCCTGGTCTTTGTAG
Primer Reverse BCR/ABL 5612: CGTGGTGGTGCATGCCTGTAGTC
Primer Reverse BCR-WT 5612: CCTAATTGTGGTCTGGCGTGAAC

Método

H ₂ O	12,7 µl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]	5 µl
dNTPs [10 mM]	0,6 µl
<i>Primer Forward BCR/ABL 5612</i> [10 µM]	1,25 µl
<i>Primer Reverse BCR/ABL 5612</i> [10 µM]	1,25 µl
<i>Primer Reverse BCR-WT 5612</i> [10 µM]	1,25 µl
<i>GoTaq</i> [500 U/µl]	0,2 µl
ADNg	3 µl
Volumen Final	25 µl

Ciclado

94°C	3 min (Desnaturalización)	} 35 ciclos
94°C	45 seg (Desnaturalización)	
60°C	30 seg (<i>Annealing</i>)	
72°C	60 seg (Elongación o extensión)	
72°C	10 min (Elongación o extensión final)	
15°C	∞	

Producto esperado de *BCR/ABL1*: 367 pb.
 Producto esperado de *BCR-WT*: 538 pb.

Protocolo 32. PCR de *ABL1/BCR* y *ABL1-WT* caso-específico #3.

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Invitrogen #5293157 USA)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNg: [100ng/µl] (protocolo 7 u 8)

** *Primer Forward* ABL/BCR 5612: AGATTAAGTGGTCAAACATA
Primer Reverse ABL/BCR 5612: CCCAGCTAAAGCCCCTACGA
Primer Reverse ABL-WT 5612: AGTCTGAAGGCCCTATCTATCTAC

Método

H ₂ O	8,7 µl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]	5 µl
dNTPs [10 mM]	0,6 µl
<i>Primer Forward</i> ABL/BCR 5612 [10 µM]	2,5 µl
<i>Primer Reverse</i> ABL/BCR 5612 [10 µM]	2,5 µl
<i>Primer Reverse</i> ABL-WT 5612 [10 µM]	2,5 µl
<i>GoTaq</i> [500 U/µl]	0,2 µl
ADNg	3 µl
Volumen Final	25 µl

Ciclado

94°C 3 min (Desnaturalización)	} 35 ciclos
94°C 45 seg (Desnaturalización)	
55°C 45 seg (<i>Annealing</i>)	
72°C 60 seg (Elongación o extensión)	
72°C 10 min (Elongación o extensión final)	
15°C ∞	

Producto esperado *ABL1/BCR*: 347 pb.
 Producto esperado *ABL1-WT*: 521 pb.

Protocolo 33. PCR de *BCR/ABL1* y *BCR-WT* caso-específico #4.

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Genbiotech #7878, ARG)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNg: 3µl [100ng/µl] (protocolo 7 u 8)

** *Primer Forward* BCR/ABL 5979: AGATGCTGACCAACTCGTG
Primer Reverse BCR/ABL 5979: GAAAACTTACAGACTCAACAGC
Primer Reverse BCR-WT 5979: TGGGCCAAAAACATACTCA

Método

H ₂ O	12,7 µl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]	5 µl
dNTPs [10 mM]	0,6 µl
<i>Primer Forward</i> BCR/ABL 5979 [10 µM]	1,25 µl
<i>Primer Reverse</i> BCR/ABL 5979 [10 µM]	1,25 µl
<i>Primer Reverse</i> BCR-WT 5979 [10 µM]	1,25 µl
<i>GoTaq</i> [500 U/µl]	0,2 µl
ADNg	3 µl
Volumen Final	25 µl

Ciclado

94°C 3 min (Desnaturalización)	}
94°C 45 seg (Desnaturalización)	

55°C	45 seg (<i>Annealing</i>)	35 ciclos
72°C	60 seg (Elongación o extensión)	
72°C	10 min (Elongación o extensión final)	
15°C	∞	

Producto esperado de *BCR/ABL1*: 398 pb.

Producto esperado de *BCR-WT*: 647 pb.

Protocolo 34. PCR de *ABL1*/y *ABL1-WT* caso-específico #4.

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Genbiotech #8283, ARG)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNg: 3µl [100ng/µl] (protocolo 7 u 8)

** *Primer Forward ABL/BCR 5979*: ACCACGCCAGCTAATTGTTGTAT

Primer Reverse ABL/BCR 5979: GGAGAGGAGGGCTGGGAGGAC

Primer Reverse ABL-WT 5979: CATGGTCCTTTATTTTGTA

Método

H ₂ O	12,7 µl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]	5 µl
dNTPs [10 mM]	0,6 µl
<i>Primer Forward ABL/BCR 5979</i> [10 µM]	1,25 µl
<i>Primer Reverse ABL/BCR 5979</i> [10 µM]	1,25 µl
<i>Primer Reverse ABL-WT 5979</i> [10 µM]	1,25 µl
<i>GoTaq</i> [500 U/µl]	0,2 µl
ADNg	3 µl
Volumen Final	25 µl

Ciclado

94°C	3 min (Desnaturalización)	} 35 ciclos
94°C	45 seg (Desnaturalización)	
58°C	45 seg (<i>Annealing</i>)	
72°C	60 seg (Elongación o extensión)	
72°C	10 min (Elongación o extensión final)	
15°C	∞	

Producto esperado *ABL1/BCR*: 726 pb.

Producto esperado *ABL1-WT*: 689 pb.

Protocolo 35. PCR de *BCR/ABL1* y *BCR-WT* caso-específico #5.

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Genbiotech #8283, ARG)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNg: 3µl [100ng/µl] (protocolo 7 u 8)

** *Primer Forward* BCR/ABL 6039: GGCTGCTGCTGGGTGGTTGA
Primer Reverse BCR/ABL 6039: CTGGAGGGAGAGGGGGAAGTATT
Primer Reverse BCR-WT 6039: AGTGGCTGAGTGGACGATGACA

Método

H ₂ O	12,7	µl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]	5	µl
dNTPs [10mM]	0,6	µl
<i>Primer Forward</i> BCR/ABL 6039 [10 µM]	1,25	µl
<i>Primer Reverse</i> BCR/ABL 6039 [10 µM]	1,25	µl
<i>Primer Reverse</i> BCR-WT 6039 [10 µM]	1,25	µl
<i>GoTaq</i> [500 U/µl]	0,2	µl
ADNg	3	µl
Volumen Final	25	µl

Ciclado

94°C	3 min (Desnaturalización)	} 30
94°C	45 seg (Desnaturalización)	
57°C	45 seg (<i>Annealing</i>)	
72°C	60 seg (Elongación o extensión)	
72°C	10 min (Elongación o extensión final)	
15°C	∞	

Producto esperado *BCR/ABL* 1: 349 pb.
 Producto esperado *BCR-WT*: 576 pb.

Protocolo 36. PCR de *ABL1*/y *ABL1-WT* caso-específico #5.

Materiales

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Genbiotech #8283, ARG)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNg: 3µl [100ng/µl] (protocolo 7 u 8)

** *Primer Forward* ABL/BCR 6039: AGGCGTGAGCTACTGTGTCTGG
Primer Reverse ABL/BCR 6039: GAGGGGGTTCGGGGTGATGT
Primer Reverse ABL-WT 6039: AAGAAAAGTACTGGAGGGAGAGG

Método

H ₂ O	8,3	µl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]	5	µl
dNTPs [10 mM]	1	µl
<i>Primer Forward</i> ABL/BCR 6039 [10 µM]	2,5	µl
<i>Primer Reverse</i> ABL/BCR 6039 [10 µM]	2,5	µl
<i>Primer Reverse</i> ABL-WT 6039 [10 µM]	2,5	µl
<i>GoTaq</i> [500 U/µl]	0,2	µl
ADNg	3	µl
Volumen Final	25	µl

Ciclado

94°C	3 min (Desnaturalización)	}
94°C	45 seg (Desnaturalización)	

57°C	45 seg (<i>Annealing</i>)	35 ciclos
72°C	90 seg (Elongación o extensión)	
72°C	10 min (Elongación o extensión final)	
15°C	∞	

Producto esperado *ABL1/BCR*: 1425 pb.

Producto esperado *ABL1-WT*: 684 pb.

Protocolo 37. PCR de *BCR/ABL1* y *BCR-WT* caso-específico #6

Material

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Genbiotech #8283, ARG)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNg: 3µl [100ng/µl] (protocolo 7 u 8)

** *Primer Forward BCR/ABL 5920*: CCCCTTCCTGTTAGCACTTTTGA

Primer Reverse BCR/ABL 5920: GGAGCCGAGATCACGCCACTA

Primer Reverse BCR-WT 5920: AGGCAGGTGACAAGCTAACTCT

Método

H ₂ O	12,7 µl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]	5 µl
dNTPs [10 mM]	0,6 µl
<i>Primer Forward BCR/ABL 5920</i> [10 µM]	1,25 µl
<i>Primer Reverse BCR/ABL 5920</i> [10 µM]	1,25 µl
<i>Primer Reverse BCR-WT 5920</i> [10 µM]	1,25 µl
<i>GoTaq</i> [500 U/µl]	0,2 µl
ADNg	3 µl
Volumen Final	25 µl

Ciclado

94°C	3 min (Desnaturalización)	} 35 ciclos
94°C	45 seg (Desnaturalización)	
58°C	45 seg (<i>Annealing</i>)	
72°C	60 seg (Elongación o extensión)	
72°C	10 min (Elongación o extensión final)	
15°C	∞	

Producto esperado de *BCR/ABL1*: 367 pb.

Producto esperado de *BCR-WT*: 600 pb.

Protocolo 38. PCR de *ABL1-WT* caso-específico #6.

Material

- Ciclador
- Agua libre de nucleasas.
- *GoTaq DNA Polymerase* (Promega Corp. #M3005, USA)
- *Primers* específicos (Genbiotech #8283, ARG)**.
- dNTPs (PB-L Productos SRL #IK0101).
- ADNg: 3µl [100ng/µl] (protocolo 7 u 8)

** *Primer Forward* ABL/BCR 5920: TTGGCCTCCCGAAGTGG
Primer Reverse ABL-WT 5920: GTAACACTAGCGCCATCACT

Método

H ₂ O	8,7 μl
<i>Buffer GoTaq</i> [5X]	5 μl
dNTPs [10 mM]	0,6 μl
<i>Primer Forward</i> ABL/BCR 5920 [10 μM]	2,5 μl
<i>Primer Reverse</i> ABL-WT 5920 [10 μM]	2,5 μl
<i>GoTaq</i> [500 U/μl]	0,2 μl
ADNg	3 μl
Volumen Final	25 μl

Ciclado

94°C	3 min	(Desnaturalización)	} 35 ciclos
94°C	45 seg	(Desnaturalización)	
57°C	45 seg	(<i>Annealing</i>)	
72°C	60 seg	(Elongación o extensión)	
72°C	10 min	(Elongación o extensión final)	
15°C	∞		

Producto esperado de *BCR-WT*: 772 pb.

ABL1: Gen *ABL1* o gen homólogo al Oncogen de la Leucemia Murina de Abelson 1 o proto-oncogen de Tirosina Kinasa no receptora 1.

ABL1/BCR: Gen quimérico recíproco del gen quimérico *BCR/ABL1* resultado de la translocación entre los cromosomas 9 y 22.

ACAs: Alteración cromosómica adicional

ADN: ácido desoxiribonucleico.

ADNc: ADN copia. ADN obtenido a partir de ARNm mediante el proceso de retrotranscripción.

ANM: Academia Nacional de Medicina.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ASS1: gen Arginina Succinato Sintetasa.

BAC/PAC: del inglés, *bacterial artificial chromosome/phage artificial chromosome*, sistemas de clonado de ADN.

BCR: Gen *BCR* o gen de la Región del Cluster de Ruptura o Gen de la proteína activante de GTPasa y RhoGEF.

BCR/ABL1: Gen quimérico *BCR/ABL1* resultado de la translocación entre los cromosomas 9 y 22.

CMHs: células madre hematopoyéticas.

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

der(9): cromosoma 9 derivado de la translocación t(9;22)(q34;q11).

dNTPs: deoxiribonucleótidos. Se refiere a los 4 deoxiribonucleotidos encontrados en el ADN: dATP, dTTP, dGTP y dCTP.

EDTA: anticoagulante ácido de etilen-diamino-tetra-acético.

EMR: enfermedad mínima residual.

FISH: hibridación *in situ* con fluorescencia, del inglés: *fluorescent in situ hybridization*.

FoSTeS: del inglés, *Fork Stalling and Template Switching*. Mecanismo postulado para explicar rearrreglos complejos que se basa en el colapso de la horquilla de replicación debida a rupturas o estructuras secundarias en el ADN y posterior "salto" de la polimerasa.

GRCh: del inglés, *Genome Reference Consortium Human*.

GST: Gen supresor de tumor.

H₂O_d: agua destilada.

IAC: mezcla de alcohol isoamílico y cloroformo en una proporción 1:24 respectivamente.

I-LD-PCR: PCR inversa de larga distancia (del inglés, *inverse long distance PCR*).

IMEX: Instituto de Medicina Experimental.

IM: Imatinib.

INF- α : interferón alfa.

ITKs: inhibidores de tirosina kinasa.

LG: línea germinal.

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda.

LMC: leucemia mieloide crónica.

LMC-CB: leucemia mieloide crónica en crisis blástica.

LMC-FA: leucemia mieloide crónica en fase acelerad.

LMC-FC: leucemia mieloide crónica en fase crónica.

LNC: Leucemias Neutrofílicas Crónicas.

LINE: del inglés, Long Interspersed Nuclear Elements.

M-BCR: del inglés, *major breakpoint cluster region*. Sitio de ruptura de BCR en LMC.

μ -BCR: del inglés, *micro breakpoint cluster region*. Sitio de ruptura de BCR en LNC

m-BCR: del inglés, *minor breakpoint cluster region*. Sitio de ruptura de BCR en LLAs.

MO: Médula ósea..

NHEJ: del inglés, *Non Homologous End Joining*. Mecanismo de reparación del ADN.

OR: *odd ratio*.

p190^{Bcr/Abl1} : proteína quimérica Bcr/Abl1 de 190 KDa.

p210^{Bcr/Abl1} : proteína de fusión clásica Bcr/Abl1 de 210 KDa.

p230^{Bcr/Abl1} : la proteína Bcr/Abl1 de 230 KDa.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *polymerase chain reaction*).

PCR-PE: PCR *BCR/ABL1* genómico paciente específico.

Ph: cromosoma *Philadelphia*. Cromosoma derivado de la translocación recíproca t(9;22)(q34;q11).

PK: proteinasa K.

PTGES: gen Prostaglandina E Sintetasa.

qRT-PCR: Retro-transcripción y PCR cuantitativa.

RCg: respuesta citogenético.

RCgC: respuesta citogenética completa

RCgMa: respuesta citogenética mayor.

RCgMen: respuesta citogenética menor

RCgMin: respuesta citogenética mínima.

RCgN: respuesta citogenética nula.

RCgP: respuesta citogenética parcial.

RCLB: (*red cells lysis buffer*) buffer de lisis de glóbulos rojos.

RHC: respuesta hematológica completa (RHC).

RHN: respuesta hematológica nula.

RHP: respuesta hematológica parcial.

RM: respuesta molecular.

RMMa: respuesta molecular mayor.

RMMen: respuesta molecular menor.

RMMin: respuesta molecular mínima.

RMN: respuesta molecular nula.

RPM: revoluciones por minuto.

RT: retrotranscripción.

SINE: del inglés, *short interspersed elements*.

SMARCB1: gen Miembro 1, Tipo- SWI/SNF Modificador de Cromatina Dependiente de Actina Asociado a Matriz de la Subfamilia B.

SP: Sangre periférica.

STR: del inglés, *short tandem repeats*.

TA: temperatura ambiente.

TE: solución de Tris-EDTA.

TK: Tirosina Kinasa.