

## DESARROLLO DE REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN CUANTITATIVA DEL GEN DE FUSIÓN PML-RARA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL.

**Camila, Belavi**

Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas  
Área temática: Ciencias Biológicas  
Sub-área: Biotecnología  
Grupo: Y

### INTRODUCCIÓN

El 95% de las leucemias promielocíticas agudas (LPA) se deben a la traslocación cromosómica t(15;17)(q22;q21) resultando en la fusión génica PML (Leucemia Promielocítica) – RAR $\alpha$  (Receptor de Ácido Retinoico Alfa), que codifica para una proteína híbrida que bloquea la diferenciación de los promielocitos. El gen de fusión presenta tres subtipos moleculares según el punto de corte en el gen PML, siendo las variantes bcr1 (*breakpoint cluster region*) y bcr3 las de mayor frecuencia de aparición, 55% y 40% respectivamente (Revisado por Castro-Mujica y col, 2013). El diagnóstico molecular de estas variantes es de gran importancia clínica para el tratamiento y seguimiento del paciente. Actualmente, en Argentina no se producen reactivos de diagnóstico *in vitro* para la detección de estos genes de fusión y los kits utilizados en laboratorios especializados son importados, implicando altos costos, largos tiempos de espera y dificultades logísticas a la hora de realizar estas prestaciones.

### OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar reactivos de diagnóstico de base biotecnológica para conformar un kit que permita la cuantificación, mediante PCR en tiempo real de los transcritos PML-RAR $\alpha$  en sus variantes más frecuentes. El mismo incluye: 1) calibradores en distintas concentraciones que se utilizan para la confección de curvas de calibrado, 2) estándares de ARN de alta y baja expresión de los genes de fusión que permitan controlar distintos pasos de la cuantificación, 3) oligonucleótidos y sondas fluorescentes específicos para cada variante de PML-RAR $\alpha$  y 4) mixes de reactivos listos para usar durante la etapa de amplificación.

### METODOLOGÍA

#### **A- Estudio de las secuencias consenso de las diferentes variantes de PML-RAR $\alpha$ .**

Las secuencias génicas fueron estudiadas mediante un software específico. Se diseñaron oligonucleótidos para el clonado direccional de las variantes bcr1 y bcr3 del gen PML-RAR $\alpha$ . Se seleccionaron aquellos que presentaron las mejores características termodinámicas.

#### **B- Clonado molecular de los genes de fusión PML-RAR $\alpha$ bcr1 y bcr3.**

Se realizó el clonado molecular de las secuencias de los genes de fusión PML-RAR $\alpha$  bcr1 y bcr3. Para ello, a partir de una muestra de paciente sano se extrajo el ADN genómico del cual se amplificaron las regiones correspondientes a los genes PML(bcr1), PML(bcr3) y RAR $\alpha$  mediante PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados anteriormente.

Los genes de fusión PML-RAR $\alpha$  bcr1 y bcr3 se construyeron en forma recombinante, mediante la ligación direccional de sus extremos usando enzimas de restricción específicas y posterior ligación con T4 DNA ligasa. Las fusiones se insertaron en el vector plasmídico pBluescriptII SK(-) obteniéndose los plásmidos recombinantes pBlueSK-PML-RAR $\alpha$  bcr1 y pBlueSK-PML-RAR $\alpha$  bcr3. Posteriormente se transformaron bacterias competentes *E.coli*/DH5 $\alpha$ . Se picaron colonias blancas, se realizaron minipreparaciones y luego se efectuó PCR para confirmar si los clones obtenidos presentaban el inserto adecuado. Para estas PCR se utilizaron los oligonucleótidos y la sonda de hidrólisis específicos recomendados por el programa Europeo Contra el Cáncer (*Europe Against Cancer -EAC- program*) (Gabert y col, 2003).

### **C- Generación y purificación de calibradores y estándares para la cuantificación del gen PML-RAR $\alpha$ por PCR en tiempo real.**

Los calibradores de PML-RAR $\alpha$  bcr1 y bcr3 fueron constituidos por plásmidos recombinantes linealizados que se utilizaron en distintas concentraciones (rango:  $10^6$ – $10^1$  copias/tubo) para la confección de curvas estándar. Estas curvas se utilizaron para la cuantificación de los genes de fusión. Para la obtención de los calibradores se hicieron crecer cultivos de LB-Ampicilina inoculados con los plásmidos recombinantes pBlueSK-PML-RAR $\alpha$  bcr1 y pBlueSK-PML-RAR $\alpha$  bcr3 a 37°C, 180 rpm, toda la noche. Se realizó minipreparación de los cultivos utilizando un Kit comercial (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems - Promega) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, se procedió a linealizarlos digiriéndolos con la enzima de restricción (BamHI). La determinación del número de copias de los plásmidos se realizó por espectrofotometría y se confeccionaron las curvas de calibrado en las concentraciones antes mencionadas. Los estándares consistieron en ARN de los distintos genes de fusión en una concentración conocida ( $10^5$  y  $10^2$  copias/tubo) y diluidos en ARN humano normal. Éstos permiten controlar los pasos de transcripción reversa y PCR. Los ARN de los genes de fusión se obtuvieron por transcripción *in vitro* de los plásmidos recombinantes pBlueSK-PML-RAR $\alpha$  bcr1 y pBlueSK-PML-RAR $\alpha$  bcr3 utilizando la enzima T7 ARN polimerasa. Luego, se determinaron sus concentraciones por espectrofotometría y se mezclaron con ARN de individuo sano. Los estándares se incorporan en todas las corridas de PCR.

### **D-Determinación de características analíticas de los kits.**

Se determinaron los límites de blanco (LoB) y de detección (LoD) siguiendo las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) publicado en la guía EP17-A (Armbruster DA., Pry T, 2008). Para la determinación del LoB se utilizaron muestras de sangre periférica de 12 individuos sanos, mientras que para la determinación del LoD se usaron muestras de 5 pacientes con LPA en tratamiento. En primera instancia, se extrajo el ARN de células blancas utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se obtuvo el ADNc mediante transcripción reversa. Se cuantificó la expresión de PML-RAR $\alpha$  bcr1 y bcr3 por PCR en tiempo real utilizando oligonucleótidos y sonda de hidrólisis recomendados por la EAC (Gabert y col, 2003) y usando las curvas estándar construidas con los calibradores previamente obtenidos. Se empleó la expresión de ABL como gen normalizador. La cuantificación de ABL se realizó utilizando un kit desarrollado previamente por el Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa, FCB; UNL. A partir de estas determinaciones se calculó el LoB y el LoD. Los resultados fueron expresados como número de copias de PML-RAR $\alpha$  normalizado al número de copias de ABL (NCN).

Se evaluó la precisión interensayo e intraensayo. Para la primera se realizaron PCR en tiempo real de 5 muestras de pacientes con LPA en tratamiento, en tres días

Proyecto "DESARROLLO DE REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN CUANTITATIVA DEL GEN DE FUSIÓN PML-RARA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL" beneficiado por la Fundación Nuevo Banco de Santa Fe con una Beca del Programa de Becas para Proyectos de Innovación Tecnológica – Edición 2014.

Director: Verónica Bosquiazzo.

independientes, por tres operarios diferentes. A partir de los valores obtenidos se calcularon las desviaciones estándar (SD) y coeficientes de variación (CV%) interensayos para los números de copias (CN) y números de copias normalizados (NCN) para cada variante de PML-RAR $\alpha$ . Para la determinación del coeficientes de variación (CV%) intraensayos se calcularon las SD y los CV% de los Ciclos Umbrales (*Threshold Cycle, C<sub>T</sub>*) (evaluados por quintuplicado) de dos muestras de cada variante.

## RESULTADOS

### Curvas estándar para las variantes de PML-RAR $\alpha$ :

A partir de los calibradores obtenidos se construyeron las curvas estándar para las variantes bcr1 y bcr3 por PCR en tiempo real (figura 1). Estas curvas se utilizan para la cuantificación de cada variante del gen de fusión.

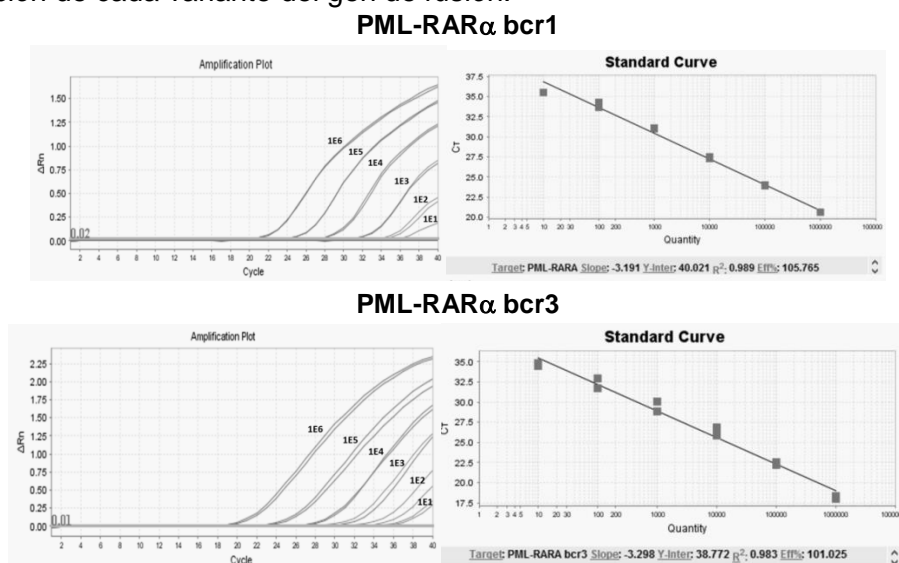


Figura1: **Izquierda:** Curvas de amplificación para los genes de fusión PML-RAR $\alpha$  utilizando oligonucleótidos y sonda específica recomendadas por EAC. Se muestra la señal de fluorescencia en cada ciclo de reacción. **Derecha:** Curvas estándar generadas a partir de las curvas de amplificación, muestran el número de copias de plásmido recombinante en función del promedio del Ciclo Umbral (*Threshold Cycle, C<sub>T</sub>*).

### Estándares de ARN:

Los estándares de ARN obtenidos en concentraciones de  $10^5$  y  $10^2$  copias/tubo de PML-RAR $\alpha$  bcr1 y bcr3 se corrieron en una PCR junto con los calibradores en las mismas concentraciones. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Valores de  $C_T$  obtenidos para los estándares de alta y baja expresión de PML-RAR $\alpha$  bcr1 y bcr3 vs calibradores.

Estándares PML-RAR $\alpha$ bcr1	$C_T$ estándar	$C_T$ calibrador
$10^5$ copias/tubo	24,20	23,89
$10^2$ copias/tubo	33,00	32,44
Estándares PML-RAR $\alpha$ bcr3	$C_T$ estándar	$C_T$ calibrador
$10^5$ copias/tubo	23,71	23,12
$10^2$ copias/tubo	33,80	33,67

Para evaluar la estabilidad de los estándares en el tiempo se volvieron a evaluar estas muestras 12 meses después de almacenarlos a  $-80^{\circ}\text{C}$ , obteniendo valores similares.

### Características analíticas

PML-RAR $\alpha$  bcr1: **LoB:** 0,326 NCN y **LoD:** 0,596 NCN.

PML-RAR $\alpha$  bcr3: **LoB:** 0,075 NCN y **LoD:** 0,166 NCN.

**Precisión Interensayo:** PML-RAR $\alpha$  bcr1: CV% NC: 24,43; CV% NCN: 24,28.

PML-RAR $\alpha$  bcr3: CV% NC: 25,24; CV% NCN: 26,04.

**Precisión Intraensayo:** Muestra alto NC PML-RAR $\alpha$  bcr1: CV% C<sub>T</sub>: 0,53.

Muestra bajo NC PML-RAR $\alpha$  bcr1: CV% C<sub>T</sub>: 0,83.

Muestra alto NC PML-RAR $\alpha$  bcr3: CV% C<sub>T</sub>: 1,15.

Muestra bajo NC PML-RAR $\alpha$  bcr3: CV% C<sub>T</sub>: 1,29.

## CONCLUSIONES

Las curvas estándares construidas mediante el uso de plásmido, ofrecen la posibilidad de cuantificar directamente el número de copias de los transcritos de PML-RAR $\alpha$ . Los plásmidos son calibradores adecuados para la normalización de análisis de PCR cuantitativa.

Las curvas de calibrado obtenidas demostraron linealidad en el rango establecido ( $10^6$ - $10^1$  copias/tubo) y buenos valores de eficiencia (105,76% y 101,25% para bcr1 y bcr3, respectivamente). Ambas curvas cumplen con los criterios de calidad (linealidad, pendiente y  $r^2$ ) especificados por la EAC (Gabert y col, 2003).

Los estándares de ARN de alta y baja expresión generados *in vitro* demostraron estabilidad durante 12 meses y confirmaron su utilidad como control de los pasos de cuantificación.

En los ensayos de precisión, se observó buena homogeneidad en los resultados para ambas variantes de PML-RAR $\alpha$ . La variabilidad observada para CV% de CN y NCN son menores a lo publicado para un kit comercial (IPSOGEN). Los valores obtenidos son esperables debido a que en el cálculo se tiene en cuenta la variación del gen control ABL. La precisión Intraensayo fue por debajo del 2%, comparable a los valores presentados por el kit comercial.

La posibilidad de brindar kits para estas determinaciones en nuestro país tiene la intención de apostar a la sustitución de importaciones de productos médicos, política promovida intensamente en los últimos años, como así también beneficiar al sector de la salud ya que le permitirá disminuir sus costos en análisis clínicos en áreas muy sensibles como la oncohematología.

## BIBLIOGRAFÍA

**Armbruster D.A.,Pry T.**, 2008. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. The Clinical Biochemist Reviews. 29(Suppl. 1):S49-S52.

**Castro-Mujica M.C., Sulcahuamán-Allende Y.** Subtipos moleculares de PML/RAR $\alpha$  en pacientes con leucemia promielocítica aguda. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2013; 30: 37-40.

**GabertJ., BeillardE., van der VeldenV.H.J., BiW., GrimwadeD., PallisgaardN., y col**,2003. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. Leukemia; 17: 2318–2357.

Proyecto "DESARROLLO DE REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN CUANTITATIVA DEL GEN DE FUSIÓN PML-RARA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL" beneficiado por la Fundación Nuevo Banco de Santa Fe con una Beca del Programa de Becas para Proyectos de Innovación Tecnológica – Edición 2014.

Director: Verónica Bosquiazzo.