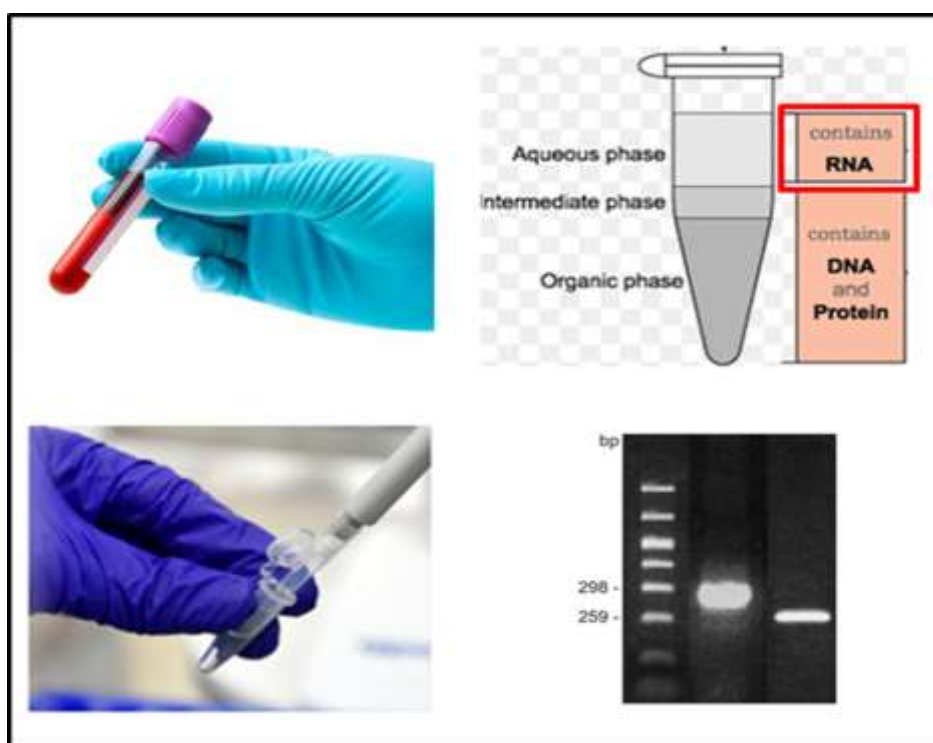


# **GUÍA DE PROCEDIMIENTO**

## **DETECCIÓN MOLECULAR DEL GEN DE FUSIÓN**

### **BCR-ABL p190**

**UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO SUB**  
**UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO –GENÉTICA**



Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico-Genética	<ul style="list-style-type: none"><li>• Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento</li><li>• Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico</li><li>• Unidad de Gestión de la Calidad</li></ul>	<b>Dra. Elizabeth Zulema</b> <b>Tomás Gonzales de Palomino</b> Directora del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja



## GUÍA DE PROCEDIMIENTO

### DETECCIÓN MOLECULAR DEL GEN DE FUSIÓN BCR-ABL p190

I.	Título .....	3
II.	Finalidad .....	3
III.	Objetivos .....	3
	a. Objetivos Generales.....	3
	b. Objetivos Específicos .....	3
IV.	Ámbito de aplicación .....	3
V.	Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPMS .....	4
VI.	Consideraciones Generales .....	4
	a. Definiciones Operativas.....	4
	1. Definición del Procedimiento .....	4
	2. Aspectos Epidemiológicos importantes .....	4
	3. Consentimiento Informado.....	4
	b. Conceptos básicos.....	5
	c. Requerimientos Básicos .....	5
VII.	Consideraciones Específicas .....	7
	a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:.....	7
	b. Indicaciones.....	11
	1. Indicaciones Absolutas .....	11
	2. Indicaciones Relativas.....	11
	c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes.....	11
	d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes:.....	11
	e. Contraindicaciones .....	11
VIII.	Recomendaciones .....	11
IX.	Autores, Fecha y Lugar.....	12
X.	Anexos.....	13
XI.	Bibliografía.....	14



## GUÍA DE PROCEDIMIENTO

### DETECCIÓN MOLECULAR DEL GEN DE FUSIÓN BCR-ABL p190

#### I. Título

Guía de Procedimiento: Detección Molecular del Gen de Fusión BCR-ABL p190.

#### II. Finalidad

Contribuir con un instrumento de apoyo y mejora continua en los servicios de salud del INSN San Borja, garantizando la calidad en el desarrollo del Procedimiento: Detección molecular del gen de fusión *BCR-ABL* p190 mediante técnicas moleculares a partir de muestras de sangre periférica o aspirado de médula ósea.

#### III. Objetivos

##### a. Objetivos Generales

Estandarizar las guías para una detección, sensible, rápida y simple para del gen de BCR-ABL p190, para realizar o confirmar el diagnóstico y estratificación de riesgos de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA).

##### b. Objetivos Específicos

Minimizar la ocurrencia de falsos positivos evitando contaminaciones cruzadas.

Prevenir la ocurrencia de falsos negativos mediante la obtención de ARN de alta calidad y uso de un control interno basado en un gen constitutivo ("housekeeping").

#### IV. Ámbito de aplicación

La presente Guía de Procedimiento es de aplicación en Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico – Genética de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento del Instituto Nacional de Salud del Niño, San Borja.

La población objetivo la constituyen todas las personas en edad pediátrica que requieran la detección molecular del gen de fusión BCR-ABL p190, a nivel nacional.

**V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPMS**

Nombre del Procedimiento	Código CPMS
Detección Molecular del Gen de Fusión BCR-ABL p190	<b>81207.03</b>

**VI. Consideraciones Generales**

El gen de fusión BCR-ABL p190 codifica una proteína con elevada actividad tirosina quinasa, el cual ejerce sus efectos interfiriendo con las vías de transducción de señal celular como el control de la muerte celular, la proliferación celular y la adhesión célula-célula. La técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR) es utilizada para la detección cualitativa de la expresión del gen de fusión BCR-ABL p190 a través de la creación de transcritos de ADN complementarios (cDNA) a partir del ARN extraído de la muestra del paciente, utilizando iniciadores (“primers”) específicos de la región o zona específica de rompimiento y fusión.

**a. Definiciones Operativas****1. Definición del Procedimiento**

El procedimiento de RT-PCR para la detección molecular del gen de fusión BCR-ABL p190 se realiza a partir de muestras de sangre periférica o aspirado de médula ósea. Este comprende la extracción y cuantificación del ARN total del paciente, la transcripción reversa a ADN complementario (cDNA) y la amplificación de la región específica del gen de fusión por PCR, incluyéndose un control positivo y un control interno para evitar falsos negativos.

**2. Aspectos Epidemiológicos importantes**

El gen de fusión BCR-ABL p190 ha sido identificado casi exclusivamente en Leucemia Linfoblástica Aguda Ph+. El 60% de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda Ph+ presenta esta variante.

**3. Consentimiento Informado**

No aplica.

## **b. Conceptos básicos**

- **Leucemia linfoblástica aguda (LLA):** Es un tipo de cáncer de sangre que se origina en los glóbulos blancos jóvenes llamados linfocitos en la médula ósea. Los adultos y los niños pueden contraerla, pero con mayor frecuencia se diagnostica en personas más jóvenes.
- **Gen de fusión BCR-ABL p190:** Gen que codifica una proteína de fusión de 190-kD (p190) que da lugar a una actividad incrementada de la tirosina quinasa alterando la cascada de señalización causando proliferación, detención de diferenciación y resistencia a la muerte celular. Esta proteína híbrida es producto de la recombinación genómica del gen BCR en el brazo largo del cromosoma 22 y el gen ABL1 del brazo largo del cromosoma 9. El cromosoma 22 alterado que contiene el gen de fusión se llama cromosoma Filadelfia. La fusión específicamente se da entre el exón denominado e1 del gen BCR con el exón 2 denominado a2 del ABL. El gen de fusión *BCR-ABL* p190 se encuentra en la mayoría de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA).
- **RT-PCR:** variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para detectar cualitativamente la expresión de ARN a través de transcritos de ADN complementarios a partir de ARN.
- **Transcripto:** es una copia de ARN de la secuencia de ADN de un gen conteniendo la información necesaria para generar un polipéptido (una proteína o la subunidad de una proteína).
- **Control interno:** control que se utiliza dentro de la reacción de PCR lo cual permite validar los resultados obtenidos de una muestra negativa, o detectar alguna falla (por inhibición) en la PCR que podrían causar la obtención de resultados falsos negativos.
- **“Housekeeping” o gen constitutivo:** es aquel que se expresa y detecta en cualquier célula bajo condiciones normales o pato-fisiológicas de un organismo y por lo tanto se puede utilizar como control interno en una prueba de PCR permitiendo la detección de falsos negativos.
- **Safe-Green™:** colorante de carga comercial para visualización de ácidos nucleicos en agarosa. Se mezcla directamente con las muestras antes de cargarlas en el gel. El producto se distribuye como colorante de carga 6x e incluye tinte de seguimiento inerte para monitorear el progreso del gel.

## **c. Requerimientos Básicos**

Fecha: Octubre 2020	Código:GP-009/INSN-SB/USDT/SUSD-GE-V.01	Página 5 de 14
---------------------	---	----------------

## **1. Equipos Biomédicos**

- Cabina de Bioseguridad.
- Congeladora -20°C.
- Refrigeradora.
- Micro centrífuga.
- Vórtex.
- Balanza analítica.
- Termociclador.
- Cámara horizontal de electroforesis con los accesorios correspondientes (molde para hacer el gel, peine, cables para conectar a la fuente de alimentación)
- Fuente de alimentación o de poder
- Transiluminador de luz LED azul
- Foto documentador

## **2. Materiales Médicos no Fungibles**

- Micro pipeta de 0.5-10 µl.
- Micro pipeta de 2-20 µl.
- Micro pipeta de 20–200 µl.
- Rack para tubos de 0.2mL.
- Rack para tubos de 2mL.
- Frascos y probetas de vidrio para la preparación de soluciones.
- Espátulas.

## **3. Materiales Médicos Fungibles**

- Guantes de Nitrilo.
- Tubos de PCR 0.2mL.
- Tips de 10, 20 y 200 µl.

## **4. Reactivos de Laboratorio**

- Kit comercial de Transcripción Reversa.
- Buffer de PCR.
- MgCl<sub>2</sub>.
- Iniciadores (Primers) específicos del gen de fusión *BCR-ABL* p190

- dNTPs.
- Enzima Taq Polimerasa.
- Agua libre de nucleasas.
- Para la Electroforesis:
- Agarosa
- Solución Tampón TAE 50X.
- Agua destilada o desionizada.
- Colorante de ácidos nucleicos Safe-Green™ 6x.
- Marcador de Peso Molecular de 50 pb a 2000 pb.

## VII. Consideraciones Específicas

### a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:

#### 1. Extracción de ARN :

- La prueba requiere por lo menos 3 ml de sangre o de aspirado de médula ósea colectada en un tubo con anticoagulante EDTA.
- Consultar la Guía de Procedimiento de Extracción de ARN a partir de Sangre Periférica (CPT: 83891.03).

#### 2. Remoción de ADN genómico y síntesis de ADNc por RT- PCR :

El procedimiento utiliza el Kit comercial QuantiTect® Reverse Transcription.

- El ARN purificado, si está almacenado a -20 °C, se descongela a temperatura ambiente (15° a 25°C), como también el buffer de eliminación de ADNg contaminante (“gDNA Wipeout buffer”), buffer de transcriptasa reversa (“Quantiscript RT Buffer”) mezcla de iniciadores (“RT Primer Mix”), y el agua libre de RNasa (“RNase-free water”); mientras que la enzima transcriptasa reversa (RT) se mantiene a -20°C hasta su posterior uso.
- Homogenizar cada tubo en un vórtex y centrifugar brevemente (spin de 5 segundos aprox.) para recoger el líquido residual de los lados de los tubos. En un tubo de PCR 0.2 mL colocar 2 µL del buffer gDNA Wipeout, y un volumen que contenga ~500 ng de ARN. Completar con agua libre de RNasa hasta alcanzar un volumen final de 14 µL. Mezclarlo cuidadosamente con la micropipeta.

**NOTA:** Si configura más de una reacción, prepare un volumen de mezcla maestra (“Master mix”) un 10% mayor que el requerido para el número total

de reacciones a realizar. Luego, distribuya el volumen apropiado de mezcla maestra en tubos individuales seguidos por cada muestra de ARN.

- Llevar el tubo al termociclador y seleccionar el programa que permita incubar a 42°C por 5 min.
- A continuación, preparar una mezcla maestra o “master mix” en un tubo de 0.2 mL, añadiendo 4 µL del buffer de transcriptasa reversa (RT-buffer), 1 µL de la mezcla de iniciadores (“RT Primer Mix”), y 1 µL de la enzima Transcriptasa Reversa (“Quantiscript Reverse Transcriptase”). Mezclarlo cuidadosamente con la micro pipeta.

Nota: La enzima debe sacarse del congelador minutos antes de usarla y colocarla en hielo.

- Adicionar 6 µL del “master mix” al tubo que contiene los 14 µL del ARN limpio de ADN; mezclarlo suavemente. Llevar el tubo al termociclador y seleccionar el programa que permita incubar a 42°C por 30 min, luego a 95°C por 3 min para inactivar la transcriptasa reversa y finalmente mantener el tubo que contiene el ADNc a 4°C hasta su uso para PCR y/o almacenarlo a -20°C.

### 3. PCR para la amplificación Gen de fusión BCR-ABL p190 :

- En un tubo de 0.2 ml agregar como concentración final: Buffer PCR a 1X, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTP, 400 nM de iniciadores (“primers”) específicos del gen de fusión *BCR-ABL* p190 (ver secuencia de los primers en el anexo 1), 1 U de enzima ADN polimerasa, 3 µl de ADNc de la reacción de transcriptasa reversa y completar con agua de PCR hasta un volumen final de 25 µl. Mezclar bien con la micropipeta.
- De la misma forma se debe incluir una reacción para el control interno con los iniciadores (“primers”) específicos al gen ABL “housekeeping” (ver secuencia de los primers en el anexo 1) y otra reacción para un control negativo (que en vez de contener el ADNc se le agrega agua).



**Cuadro 1. Componentes de la PCR para la amplificación**

Componente	Volumen/ reacción	Concentración final
Buffer PCR 10X	2.5µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	2.5µl	2.5 mM
dNTPs	2.5µl	200 µM
Primers del gen de fusión <i>BCR-ABL</i> p190	2µl	400 ηM
Enzima ADN polimerasa (Hot Start)	0.2µl	1U
ADNc de la reacción de transcriptasa reversa	3µl	
Agua libre de ADNasa	12.3 µl	
Volumen total	25 µl	

- Llevar los tres tubos de 0.2ml con las distintas reacciones al termociclador y seleccionar el programa que contiene las siguientes condiciones de PCR: 95°C por 4 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 65°C por 1 min, 72°C por 1 min; y una extensión final 16°C por 1 min.
- Mantener los tubos que contienen los productos de PCR a 4 °C si se continuará con la corrida electroforética en el gel de agarosa; o proceder con su almacenamiento a -20 °C para su posterior uso.

**4. Electroforesis en Gel de Agarosa:**

Para realizar la electroforesis debe estar preparado el siguiente material antes de comenzar: muestras (productos de la PCR), marcador de peso molecular, buffer de electroforesis (TAE 1X) (ver Anexo 2) y colorante de ácidos nucleicos Safe-Green™

- Pesar la cantidad de agarosa necesaria para obtener una concentración al 2%.
- Añadir la agarosa al frasco de vidrio que contiene el buffer TAE 1X.
- Calentar la mezcla en un horno de microondas hasta que se observe que toda la agarosa se ha fundido.
- Dejar enfriar la solución de agarosa hasta una temperatura de unos 50 °C.
- Preparar el molde en el que se va a hacer el gel sellando los bordes con el dispositivo previsto para ello, y poner el peine en la posición deseada.
- Verter cuidadosamente la solución de agarosa sobre el molde nivelado y dejar que solidifique durante al menos 30 min.

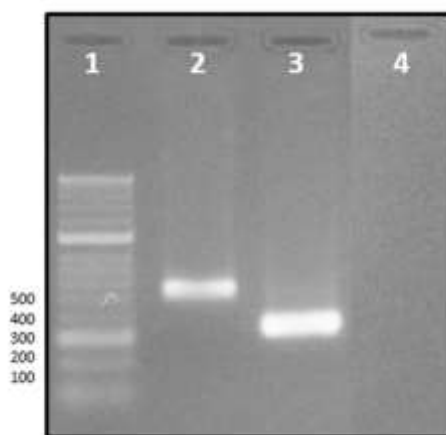
## Guía de Procedimiento: Detección Molecular de Gen de Fusión BCR-ABL p190

- Mientras mezclar 8 µl del producto de PCR con 2 µl de colorante de carga Safe-Green™ 6x. Asimismo, mezclar 5 µl del marcador de peso molecular con 1 µl del µl de colorante de carga.
- Una vez que el gel ha solidificado, retirar el sellado de los bordes y colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis.
- Añadir 50 ml de buffer de electroforesis (TAE 1x) o hasta que cubra el gel unos 3-5 mm.
- Retirar cuidadosamente el peine para que queden libres los pocillos para las muestras.
- Cargar en los pocillos las muestras.
- Conectar los cables a la fuente alimentación y aplicar un voltaje de 90 V
- Tiempo 35 minutos.

Nota: 1-5 Voltios/cm de acuerdo a la distancia entre los electrodos. El ajuste del voltaje es muy variable dependiendo de la cámara y de los tamaños que se pretenden separar, se recomienda voltajes no muy altos para tamaños muy grandes del ADN. Debe tenerse en cuenta que el ADN migra hacia el ánodo, por lo que debe disponerse correctamente la orientación del gel y de los cables. Correr el gel hasta que el colorante esté a una distancia del borde de aproximadamente un 25% de la longitud total del gel. En ese momento debe detenerse la electroforesis.

## 5. Visualización del ADN

- Colocar el gel sobre un transiluminador de luz LED azul para visualizar las bandas.
- Foto documentar el gel para su análisis y archivo.



**Figura 1.** Gel de agarosa al 2% con banda correspondiente al producto de amplificación del transcripto BCR-ABL p190 (carril 2, 521 pb). El carril 1 muestra el marcador de peso molecular; el carril 3, la banda de 277 pb correspondiente a la amplificación del “housekeeping” y el carril 4, el control negativo. Foto del Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico – Genética (INSNSB)

## 6. Análisis y Resultados:

- Analizar las bandas reportadas en el gel de agarosa (Fig.1)
- Discutir el caso de ser necesario con otros usuarios.
- Preparar el reporte con el resultado y conclusión respectiva.
- Validación del resultado por parte del médico genetista.

### b. Indicaciones

#### 1. Indicaciones Absolutas

Estudio genómico de muestras biológicas de que presenten Leucemia Linfoblástica Aguda.

#### 2. Indicaciones Relativas

De acuerdo con el criterio del médico tratante que solicita el estudio

### c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes

No aplica para este procedimiento..

### d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes:

No aplica para este procedimiento

### e. Contraindicaciones

No aplica para este procedimiento

## VIII. Recomendaciones

- Iniciar el trabajo en el laboratorio con el uso del equipo de protección personal EPP (mandil de laboratorio, guantes, gorro y mascarilla).
- Se debe realizar previamente la limpieza y desinfección de la superficie de trabajo de Cabina de Bioseguridad que se va utilizar y se proceder a prender la luz UV por 15 minutos. Luego, introducir todos los materiales tales como micro pipetas, tips, soportes para tubos y encender nuevamente la luz UV por 15 minutos.
- Las enzimas como la Transcriptasa Reversa y ADN Polimerasa deben conservar en un soporte con hielo durante su uso y una vez utilizadas guardarlas inmediatamente a -20°C.



- Evitar contaminaciones cruzadas, agregando las muestras de ARN o ADNc fuera de la cabina de seguridad donde se preparan las reacciones de transcripción reversa (RT) y PCR, respectivamente.
- Documentar las actividades que conforman el procedimiento en un cuaderno de bitácora cada vez que éstas se realicen.

## IX. Autores, Fecha y Lugar

### Nombre de Ejecutores responsables:

MSc. Oscar Dávila Carlán

Biol. Francisco Sánchez Pinto

### Lugar del procedimiento:

Laboratorio de Genética Molecular – Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico – Genética,  
Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja

### Fecha de Elaboración y Vigencia

Septiembre 2020

Vigencia: Dos años a partir de su aprobación mediante Resolución Directoral.

### Lista de Autores y correos electrónicos:

Dra. Gioconda Manassero Morales	gmanassero@insnsb.gob.pe
Dra. Kelly Franco Bustamante	kfranco@insnsb.gob.pe
Dr. Julio A. Poterico	jpoterico@insnsb.gob.pe
MSc. Oscar Dávila Carlán	odavila@insnsb.gob.pe
Biol. Francisco Sánchez Pinto	fsanchezp@insnsb.gob.pe
Biol. Cindy Miranda Miranda	cmiranda@insnsb.gob.pe
Biol. Orson Mestanza Millones	omestanza@insnsb.gob.pe
Susan Munive Goytizolo	smunive@insnsb.gob.pe

## X. Anexos

### Anexo 1

#### **Secuencia de iniciadores (“primers”) específicos para la amplificación del transcripto BCR-ABL p190 y control interno.**

- Primers *BCR-ABL* p190:
  - BCR-e1-A: 5'-GACTGCAGCTCCAATGAGAAC-3'
  - ABL-a3-B: 5'-GTTTGGGCTTCACACCATTC-3'
- Primers *ABL* (Control Interno):
  - ABL Ia: 5'-ATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCT-3'
  - ABL-D: 5'-TGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG-3'

---

### Anexo 2

#### **Soluciones**

##### **Preparación del Buffer TAE (1X):**

Para diluir el TAE 50X a 1X, se procede a tomar un volumen de 20ml del TAE 50X y llevar a 1 litro de volumen total con agua destilada o desionizada.

##### **Preparación del Buffer TAE (50X) 1L:**

Tris base, 242 g.

Acido acético glacial, 57.1 ml.

0.5 M EDTA pH 8, 100 ml.

Ajustar hasta 1 litro con agua destilada o desionizada.

El EDTA debe estar preparado previamente: Se añade al agua destilada o desionizada (un volumen 20% inferior al volumen final deseado) la cantidad adecuada de EDTA para obtener una concentración final de 0.5 M. Se ajusta el pH con NaOH hasta que el EDTA se disuelva y llegue la solución a un pH de 8. Se ajusta el volumen, se esteriliza y se conserva a temperatura ambiente.

## **XI. Bibliografía**

1. Corradi C, Fazio G, Palmi C, Rossi V, Biondi A and Cazzaniga G. 2008. Efficient detection of leukemia-related fusion transcripts by multiplex PCR applied on a microelectronic platform. *Leukemia* 22: 294–302.
2. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. 1998. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 91: 3995–4019.
3. Hermans A, Heisterkamp N, VonLindern M, Van Baal S, Meijer D, Van derPlas D, Wiedemann LM, Groffen J, Bootsma D, Grosveld G. 1987. Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell* 51: 33–40.
4. Kang, Z. J., Liu, Y. F., Xu, L. Z., Long, Z. J., Huang, D., Yang, Y., ... & Liu, Q. 2016. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chinese journal of cancer*, 35(1), 48.
5. Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. 1988. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *New Engl J Med* 319: 990–998.
6. Selleri L, vonLindern M, Hermans A, Meijer D, Torelli G, Grosveld G. Chronic myeloid leukemia may be associated with several bcr/abl transcripts including the acute lymphoid leukemia type 7 kb transcript. *Blood* 1990;75: 1146–1153.
7. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. *Nature* 1985;315: 550–554.
8. Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, et al. 1999. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13(12):1901–28.
9. Verfaillie CM. Chronic myelogenous leukemia: too much or too little growth, or both? *Leukemia* 1998;12: 136–138
10. Westbrook CA, Hooberman AL, Spino C, Dodge RK, Larson RA, Davey F, Wurster-Hill DH, Sobol RE, Schiffer C, Bloomfield CD. Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: a cancer and leukemia group B study (8762). *Blood* 1992;12: 2983–2990.