



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA
MAGISTER EN BIOQUÍMICA CLÍNICA E INMUNOLOGÍA**

**IDENTIFICACIÓN DEL GEN CEBP α EN PACIENTES CON
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA Y SU POTENCIAL USO CLÍNICO**

Profesor Guía:
Dr. Claudio Aguayo Tapia
Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía:
Dr. Mauricio Chandía
Laboratorio de Citometría de Flujo
Unidad de Anatomía Patológica
Hospital Dr. Guillermo Grant Benavente

**TESIS PARA SER PRESENTADA A LA DIRECCIÓN DE POST GRADO
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**

JUAN CARLOS RIVERA FUENTES

CONCEPCIÓN, CHILE 2023

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	¡Error! Marcador no definido.
RESUMEN.....	9
RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN	13
2. MARCO TEÓRICO.....	17
2.1.CARACTERÍSTICAS DEL GEN CEBP α	17
2.2.CEBPA EN LA HEMATOPOYESIS	18
2.3.CEBPA EN OTROS TEJIDOS.....	20
2.4.MUTACIONES EN EL GEN CEBP α	21
2.5.EXPRESIÓN INMUNOFENOTÍPICA DEL GEN CEBPA MUTADO.....	22
2.6.ESTUDIOS SOBRE MUTACIONES EN EL GEN CEBP α	23
2.7.APORTE CLÍNICO DEL ESTUDIO DEL GEN CEBP α	26
3. SOLUCIÓN PROPUESTA Y APLICABILIDAD DEL ESTUDIO DEL GEN CEBP α	28
3.1.EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DESDE SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA.....	32
3.4.ANÁLISIS DE MUTACIONES EN GEN CEBP α	32
4. HIPÓTESIS.....	36
5. OBJETIVO GENERAL	36
5.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
6. MATERIALES Y MÉTODO.....	37

6.1	DISEÑO DEL ESTUDIO	37
6.2	POBLACIÓN DE ESTUDIO	37
	Selección y tamaño de la muestra	37
	Criterios de inclusión	38
	Criterios de exclusión	38
6.3	TOMA DE MUESTRA	39
6.4	EXTRACCIÓN DE ADN POR TÉCNICA DE COLUMNA Y PERLAS.....	40
6.5	EXTRACCIÓN DE ADN POR TÉCNICA DE SALES O MICROMÉTODO	41
6.6	CUANTIFICACIÓN DEL ADN:.....	41
6.7	REPETITIVIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DE LA TÉCNICA:.....	41
6.8	ESTANDARIZACIÓN DE METODOLOGÍA DE PCR CONVENCIONAL:	41
6.9	INTEGRIDAD DEL ADN Y ESPECIFICIDAD/TAMAÑO DEL AMPLICÓN	44
7	PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
8	RESULTADOS:.....	48
8.1	ESTANDARIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE COMPLETA Y CONCENTRADO DE LEUCOCITOS	48
8.2	COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN ADN Y LOS TIPOS DE MATRICES UTILIZADAS:.....	¡Error! Marcador no definido.
8.3	APLICACIÓN DE PCR GRADIENTE PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN CEBP α DESDE MUESTRAS DE INDIVIDUOS SANOS:	58
8.4	ANÁLISIS DE LA SECUENCIACIÓN DEL GEN CEBP α EN 2 TRAMOS DE PACIENTES CON LAM.	74
9	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:	85
10	PROYECCIONES	92

REFERENCIAS	93
ANEXO 1: Protocolo dilución muestras ADN.	100
ANEXO 2: Protocolo extracción ADN genómico por columna (<i>NucleoSpin Blood</i>).....	101
ANEXO 3: Protocolo extracción ADN genómico por perlas (<i>Precellys Lysing Kit</i>).	102
ANEXO 4: Protocolo extracción ADN genómico por Sales o Micrométodo (<i>RBAC</i>).	103
ANEXO 5: Protocolo dilución de partidores.	104
ANEXO 6: Protocolo mix PCR (<i>GoTaq Green Master Mix</i>).....	105
ANEXO 7: Protocolo electroforesis en gel de agarosa.	111
ANEXO 8: Geles de integridad ADN genómico.	112
ANEXO 9: Perfil clínico general de los pacientes con LMA.	113
ANEXO 10. protocolo preparación de muestras para secuencia	114
ANEXO 11. Protocolo de extracción de ADN utilizando el kit Promega Wizard®	116
ANEXO 12: Protocolo para la identificación del gen CEBP α	112

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Partidores sentido y antisentido con su composición nucleotídica para PCR gradiente.
- Tabla 2. PCR gradiente modificada. Se muestran las etapas, temperaturas, tiempo y ciclos de reacción.
- Tabla 3. Par de Partidores usados con el tamaño de amplicón generado
- Tabla 4. Recuento de Leucocitos desde Sangre Completa y desde Concentrado mediante centrifugación
- Tabla 5. Extracción de ADN de Concentrado de Leucocitos por técnica de Columna más Perlas.
- Tabla 6. Extracción de ADN de Concentrado de Leucocitos por las técnicas de extracción Sales y Columna
- Tabla 7. Extracción de ADN de Sangre Completa por las técnicas de extracción Sales y Columna.
- Tabla 8. PCR gradiente utilizando ADN de pacientes normales
- Tabla 9. Muestras de pacientes con leucemia mieloblástica aguda (LAM), cultivo (THP) y control normal (N).
- Tabla 10. PCR gradiente utilizando ADN de paciente leucémico
- Tabla 11. Protocolo de mezcla para la amplificación del gen CEBPA de paciente N°4 con leucemia
- Tabla 12. Protocolo de mezcla para la amplificación del gen CEBPA de paciente N°6 con leucemia
- Tabla 13. Amplificación del gen CEBPA de muestras con leucemia para envío a secuenciación.
- Tabla 14. Partidores nuevos y diluciones requeridas.
- Tabla 15. Tabulación de perfil clínico general de pacientes con LMA con pronóstico adverso y favorable.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las mutaciones y variantes de CEBP α identificadas.

Figura 2. Tamaño de amplicones en pares de bases (pb) con sus respectivos partidores sentido y antisentido.

Figura 3. Comparación de extracción de ADN entre las técnicas por Columna más Perlas versus Columna.

Figura 4. Comparación de extracción de ADN a través del método de sales entre las matrices sangre total y concentrado de leucocitos.

Figura 5. Comparación de extracción de ADN a través del método de columna entre las matrices sangre total y concentrado de leucocitos.

Figura 6. Comparación de extracción de ADN entre las técnicas por sales y Columna.

Figura 7. Especificidad y tamaño del amplicón de mezclas 1, 2 y 3 a una temperatura de 60°C.

Figura 8. Especificidad y tamaño del amplicón de mezclas 1, 2 y 3 a una temperatura de 62°C.

Figura 9. Especificidad y tamaño del amplicón de mezclas 1, 2 y 3 a una temperatura de 64°C.

Figura 10. Especificidad y tamaño del amplicón de mezclas 4, 5 Y 6 a una temperatura de 60°C.

Figura 11. Especificidad y tamaño del amplicón de mezclas 4, 5 y 6 a una temperatura de 62°C.

Figura 12. Especificidad y tamaño del amplicón de mezclas 4, 5 y 6 a una temperatura de 64°C.

Figura 13. PCR gradiente para amplificación del gen CEBP α de paciente con LAM.

Figura 14. Amplificación en 2 tramos del gen CEBP α de pacientes con LAM.

Figura 15. Secuencia codificante del gen CEBP α .

Figura 16. Secuencia completa del gen CEBP α marcada con partidores y regiones TAD 1, TAD2, DBD y bZIP.

Figura 17. Electroferogramas obtenidos del tramo corto del gen CEBP α de un paciente con LAM analizado con BioEdit Sequence Alignment Editor.

Figura 18. Alineamiento entre las secuencias del tramo largo del gen CEBPA de los pacientes con LAM y la región bZIP wt

Figura 19. Ubicación de las mutaciones de acuerdo a la posición en el gen CEBPA.

Figura 20. Gel integridad Sangre Completa por técnica de Sales.

Figura 21. Gel integridad Sangre Completa por técnica de Columna.

Figura 22. Gel integridad Concentrado de Leucocitos por técnica de Sales.

Figura 23. Gel integridad Concentrado de Leucocitos por técnica de Columna.

DEDICATORIA:

Con amor sempiterno para mi Juli.

También a todas y todos quienes me apoyaron.

Gracias totales.

RESUMEN

La leucemia mieloblástica aguda (LMA) se produce por acumulación de mutaciones en células pluripotentes hematopoyéticas, provocando un bloqueo en la diferenciación, apoptosis y un aumento en la proliferación. Entre sus alteraciones moleculares se registran mutaciones puntuales en el gen CEBP α doble mutación, estas últimas se asocia con un pronóstico favorable de supervivencia global y supervivencia libre de eventos teniendo una mejor respuesta al tratamiento, en comparación con pacientes sin mutaciones en CEBP α .

El estudio molecular del gen CEBP α en adultos se menciona en la guía clínica del paciente leucémico del ministerio de salud, sin embargo, no se estudia en este grupo etario, ni tampoco en pacientes pediátricos debido a que no se encuentra disponible en ningún laboratorio clínico público de biología molecular. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen CEBP α no se ha estandarizado en los laboratorios antes señalados, debido a que la región codificante del gen presenta un alto contenido de guanina (G) citosina (C) (>65%), y una secuencia de repetición de trinucleótidos, lo que dificulta su amplificación. Para obtener la secuencia amplificada del gen CEBP α se requiere comparar y elegir una técnica de extracción de ADN (Columna, Columna más Perlas y Sales) y estandarizar la PCR por las características del gen, sugiriendo el uso de PCR gradiente con DMSO. El desarrollo de un protocolo de amplificación y secuenciación permite caracterizar el gen CEBP α en pacientes con LMA. Desarrollar de un protocolo de amplificación y secuenciación del gen CEBP α para el estudio molecular de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda. Se realizó un estudio observacional de cohorte transversal, con muestreo no probabilístico por conveniencia para una muestra de 3 personas voluntarias sin LMA durante el I semestre de 2021. Luego se realiza la extracción de ADN de 10 pacientes con LMA desde muestras de matriz sanguínea periférica y médula ósea. Se evalúan las técnicas de extracción en cuanto a concentración y pureza del ADN, costos y tiempo. Luego se realizó PCR para amplificar el gen CEBP α desde el ADN de los pacientes sanos y con LMA considerando partidores

publicados, y otros de elaboración propia, se evaluó el protocolo de amplificación, ajustando temperaturas de alineamiento y adyuvantes, como DMSO en distintas concentraciones. Se realizó electroforesis en gel de agarosa para evaluar integridad del ADN extraído y también del ADN amplificado. Luego se secuencian las regiones amplificadas por método de sanger, llegando a establecer el protocolo completo del estudio del gen CEBP α . La técnica de extracción por sales en muestras de concentrado de leucocitos fue la más óptima en cuanto a rendimiento, al observarse diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$) en cuanto a concentración de ADN con respecto a la técnica de columna. La estandarización de la PCR y la amplificación de la región codificante del gen CEBP α completa con un solo juego de partidores, y por fragmentos con dos juegos de partidores, se logró con todos los pares de partidores estudiados a una temperatura de alineamiento de 62 y 64°C, siendo posible mediante el uso de DMSO a un 3 y 8% obteniendo bandas únicas en gel de agarosa.

La secuenciación utilizada fue tipo sanger, la que mostró que, en el caso de la región amino terminal, hubo un producto secuenciado óptimo con la elaboración de una secuencia consenso. La estandarización de la técnica de extracción de ADN, PCR y secuenciación para el estudio del gen CEBP α permitirá obtener información útil en el diagnóstico de pacientes con LMA otorgándole al clínico mejores herramientas para decidir una adecuada terapia en este contexto.

Palabras claves: LMA, Gen CEBP α , Secuenciación, bZIP.

LMA: Leucemia Mieloide Aguda. CEBP α : Proteína Alfa de Unión a Potenciador CCAAT.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. DMSO:

Dimetilsulfóxido. EMR: Enfermedad Mínima Residual.

ABSTRACT

Acute myeloblastic leukemia (AML) arises from the accumulation of mutations in hematopoietic stem cells, resulting in a disruption of cell differentiation, apoptosis, and increased proliferation. One of the notable molecular alterations involves point mutations in the CEBP α gene, which have been associated with a favorable prognosis in terms of overall survival and event-free survival. Patients with CEBP α mutations tend to exhibit better treatment responses compared to those without these mutations.

Although the clinical guide for leukemic patients issued by the Ministry of Health acknowledges the molecular study of the CEBP α gene in adults, it is currently unavailable for this age group as well as pediatric patients in any public clinical laboratory specializing in molecular biology. This limitation primarily stems from the absence of standardized polymerase chain reaction (PCR) techniques for amplifying the CEBP α gene. The gene's coding region presents a high guanine (G) and cytosine (C) base content (> 65%) and includes a trinucleotide repeat sequence, posing challenges in the amplification process. Successful amplification of the CEBP α gene necessitates a comparison and selection of DNA extraction techniques and the standardization of PCR conditions based on the gene's characteristics. Developing a comprehensive protocol encompassing amplification and sequencing will enable the characterization of the CEBP α gene in AML patients.

An observational cross-sectional cohort study was conducted during the first semester of 2021. A non-probability convenience sampling method was employed, and an initial sample of three AML-free volunteers was included. Subsequently, DNA extraction was performed on peripheral blood and bone marrow samples from ten AML patients. The extraction techniques were evaluated based on DNA concentration, purity, cost, and time. PCR was then conducted to amplify the CEBP α gene in both healthy individuals and AML patients, using both published and newly designed primers. The amplification protocol underwent evaluation by adjusting annealing temperatures and incorporating adjuvants such as DMSO at varying concentrations. Agarose gel electrophoresis was utilized to assess the integrity and amplified DNA. Finally, the

amplified regions were sequenced using the Sanger method, establishing a comprehensive protocol for studying the CEBP α gene.

Among the evaluated extraction techniques, the salt extraction method employed on concentrated leukocyte samples demonstrated the most optimal performance. Significant statistical differences ($p < 0.005$) in DNA concentration were observed compared to the column technique. PCR standardization successfully accomplished the amplification of the complete coding region of the CEBP α gene using a single set of primers, as well as fragment amplification using two sets of primers. The optimal annealing temperatures for all primer pairs were determined to be 62 and 64 °C, and the use of 3% and 8% DMSO facilitated the generation of single bands in agarose gel electrophoresis. The sequencing method employed was the Sanger method, which yielded optimally sequenced products for the amino terminal region, enabling the elaboration of a consensus sequence.

Standardizing the DNA extraction, PCR, and sequencing techniques for studying the CEBP α gene will provide valuable diagnostic information for AML patients, equipping clinicians with improved tools to make informed decisions regarding appropriate therapy in this context.

1. INTRODUCCIÓN

Las leucemias representan las neoplasias hematológicas más frecuentes. Se trata de enfermedades neoplásicas de causas no bien conocidas, que se caracterizan por la transformación de células hematopoyéticas en la médula ósea en células cancerosas. Según su evolución, estas se pueden separar en agudas (células inmaduras, hialo leucémico) y crónicas (células de aspecto más maduro); y según la línea celular afectada, se clasifican en leucemias mieloides y leucemias linfoides (Sans-Sabrafen., Besses & Vives., 2006). En el caso de las Leucemias Mieloides Agudas (LMA), estas células infiltran la médula ósea, sangre periférica y otros tejidos, por lo que su acumulación desplaza a los elementos hematopoyéticos sanos, provocando insuficiencia medular e infiltración extramedular en bazo, hígado, piel, encías y sistema nervioso central, causando muerte por síndrome anémico (palidez de piel y mucosas, fatigabilidad, disnea de esfuerzo, cefalea, irritabilidad o somnolencia, taquicardia, soplos y, ocasionalmente, insuficiencia cardíaca), síndrome hemorrágico (petequias, equimosis) o síndrome infeccioso por la neutropenia que favorece infecciones bacterianas o fúngicas. Los principales síntomas y signos son: fiebre, dolor óseo no asociado a traumatismos, hematomas, sangrado espontáneo (gingivorragia y epistaxis) infecciones recurrentes, linfadenopatías y esplenomegalia (Leyto-Cruz, 2018; Valdéz et al., 2018).

La etiopatogenia de las LMA radica en la transformación de precursores hematopoyéticos a través de la adquisición de re-arreglos cromosómicos y múltiples mutaciones genéticas que bloquean la diferenciación celular y confieren ventajas

proliferativas y de supervivencia (Nichol, Assouline & Miller, 2013). Los eventos oncogénicos claves se producen por mutaciones de clase I, que activan vías que confieren ventajas proliferativas, y las mutaciones de clase II, que afectan los procesos de diferenciación celular y apoptosis (Rubnitz, Gibson & Smith, 2010). Las LAM representan el 40% de las leucemias en el mundo occidental según la Sociedad Argentina de Hematología, y constituyen del 15 al 20% de las leucemias agudas en niños, siendo la segunda en frecuencia en edad pediátrica con un pico de incidencia en la etapa neonatal y la adolescencia. En pacientes adultos representan el 80% de las leucemias agudas (Agiello et al., 2017; Valdéz et al., 2018). En EE.UU y Europa la incidencia es de 3 a 5 casos por 100.000 habitantes y la edad de presentación promedio es de 65 años (Smith, Howell, Patmore & Román, 2011). En Chile el total de casos estimados de leucemias crónicas y agudas debutantes a tratar por año sería aproximadamente entre 450 y 500 casos (MINSAL, 2013). Sin embargo, no hay datos claros al respecto, y hay escasa información publicada sobre LMA en población adulta, existiendo datos del Hospital del Salvador del año 2000, en la que se describen 117 enfermos con respuesta completa a la inducción (Puga et al., 2000). Así también existen investigaciones relacionadas con LMA, pero estas abordan otros temas como perfiles de metilación de genes supresores de tumores como factor pronóstico en LMA y estudios retrospectivos en relación al tratamiento para pacientes con LMA (Reyes et al., 2011). Una de las últimas publicaciones a nivel nacional realizada en el hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile muestra como resultados una descripción demográfica de 114 pacientes atendidos entre el 2010 y 2018, no se evidencia un

abordaje de estudios moleculares, lo que limita el esquema de tratamiento, lo que se traduce en una tasa de supervivencia global más baja de lo esperado, sobre todo en el grupo de riesgo intermedio según la European Leukemia Net (Triantafilo et al., 2022).

En cambio, la clasificación del grupo Franco – Américo – Británico (FAB), se basa exclusivamente en la morfología determinada por el grado de diferenciación y maduración de las células en subtipos desde M0 a M7 (Arber et al., 2006). La clasificación moderna de las leucemias según la Organización Mundial de la Salud (OMS) incorpora e interrelaciona la morfología, citogenética, genética molecular y marcadores inmunológicos, en un intento por construir una clasificación aplicable universalmente. La información citogenética en la clasificación de la LMA ha ayudado a mejorar la estratificación del riesgo, señalando que entre el 40 y el 50% de las LMA son citogenéticamente normales (LMA-CN). Los análisis moleculares revelan cuáles son los marcadores genéticos recurrentes (Dufour et al., 2012).

Estos subtipos genéticamente se asocian con diversas características biológicas y perfiles clínicos distintos, aunque generalmente en un paciente con LMA se pueden tener hasta cinco mutaciones genéticas (Pabst & Mueller, 2014; Avellino & Delwel, 2017). Así un 96% de pacientes con LMA debutante posee una mutación predominante, mientras que en el 86% de los pacientes con LMA presentan dos o más mutaciones predominantes (Short, Rytting & Cortes, 2018). Entre los principales genes mutados que se pueden encontrar en LMA están: NPM1 cuya función es la síntesis de ribosomas, control de la duplicación del centrosoma, reparación del ADN y regulación de la

estabilidad del genoma mediante la interacción con varias proteínas en diferentes compartimentos celulares, por lo que mutaciones en este gen provocarían la pérdida de sus funciones (Bonetti et al., 2008; Handschuh et al., 2018); FLT3-ITD que desempeña un papel clave en la proliferación, supervivencia y diferenciación de los progenitores hemopoyéticos inmaduros y cuya mutación se encontraría asociada a un pronóstico desfavorable debido a su relación con hiperleucocitosis y una mayor cantidad de blastos en médula ósea y sangre periférica, agravando la sintomatología de los pacientes con un incremento en el riesgo de recaída y disminución de la supervivencia; y CEBP α , que tiene un papel crítico en la regulación de la expresión del gen mieloide en una etapa hematopoyética temprana (Lin et al., 2014; Pabst & Mueller, 2015). En conjunto tienen un rol pronóstico de sobrevida importante, catalogando las mutaciones en CEBP α dentro del grupo con mejor pronóstico (Perea, 2011). Estas mutaciones están más frecuentemente asociadas con los subtipos, según clasificación FAB M1, M2 o M4 y son predominantemente de carácter puntual por deleciones o inserciones que afectan el marco de lectura (Martelli et al., 2013). Las mutaciones en el gen CEBP α se detectan en pacientes adultos con LMA en alrededor del 10% y la frecuencia de mutaciones reportadas en pacientes pediátricos en alrededor del 6 al 8 % (Konstandin et al., 2018).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. CARACTERÍSTICAS DEL GEN CEBP α

El gen CEBP α se localiza en humanos en el cromosoma 19q13.1, forma parte de la familia de factores de transcripción pertenecientes a la región básica de la cremallera de leucina (bZIP). Entre los que pertenecen a esta familia están CEBP α , CEBP β , CEBP δ , CEBP ϵ , CEBP γ y CEBP ζ , cuyo nombre es debido a su orden de descubrimiento y todos presentan una región N-terminal con dominios de transactivación llamados TAD1 Y TAD2 para el control de la transcripción, como una región C-terminal está constituida de un dominio bZIP, el cual es responsable de la interacción con el surco mayor del ADN (Lin et al., 2011; Koschmieder, Halmos, Levantini & Tenen, 2009; Pabst & Mueller, 2014). El gen CEBP α presenta una extensión de 1077pb y un solo exón que codifica un factor de transcripción implicado en la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos hacia la línea mieloide madura, al presentar la capacidad de unirse en forma de homodímero a ciertos promotores (Fasan et al., 2013; Hollink et al., 2011). Se han realizado estudios para determinar la importancia del gen CEBP α , donde se ha observado que la desactivación de este gen en modelos murinos y en leucemia humana, sugieren que CEBP α tiene un papel crítico en la regulación de la expresión mieloide en una etapa hematopoyética temprana (Avellino & Delwel, 2017). Así también, este gen se ha visto involucrado en monopoyesis y granulopoyesis, por ende, las mutaciones que CEBP α presenta, afectan directamente a la hematopoyesis, donde se ha encontrado en personas con LMA sea o no debutante, aunque otros estudios han pesquisado su estado mutacional en otras leucemias como en Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA),

observándose también sobreexpresión o bloqueo de su mutación en Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) como la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) (Lagunas-Rangel, 2016; Koschmieder, Halmos, Levantini & Tenen, 2009).

2.2. CEBP α EN LA HEMATOPOYESIS

El gen CEBP α en la hematopoyesis se expresa mayormente en células de linaje mielode como las células mielomonocíticas, y es específicamente sobre regulado durante la diferenciación granulocítica, teniendo por lo tanto un papel crítico en el equilibrio de la expresión del gen mielode en una etapa de diferenciación hematopoyética temprana, por lo que mutaciones en CEBP α pueden afectar directamente la hematopoyesis. El gen CEBP α tiene un rol importante debido a que es responsable de generar dos isoformas de proteínas, una de 42 KDa y otra de 30 KDa, donde la isoforma P30 es la más corta debido a que carece de 117 aminoácidos N-terminales. La p42, en el contexto hematológico, es responsable de la diferenciación celular, la que se comienza a traducir desde el primer codón de inicio (ATG), y cuenta con los 3 dominios de transactivación, mientras que la segunda proteína (p30), se traduce desde el codón 120 (segundo codón ATG) y carece de las secuencias N-terminales y esto hace que no presente dos dominios de transactivación, los que son relevantes puesto que esta región puede interactuar con componentes de la maquinaria transcripcional como es E2F, capaz de actuar como activador o represor de la transcripción.

La p30 está encargada de la proliferación celular, pero carece de la capacidad para promover la diferenciación terminal y la detención de la proliferación (Koschmieder, Halmos, Levantini & Tenen, 2009; Pabst & Mueller, 2014). En un contexto normal existe un balance de producción entre p42/p30, debido a que normalmente esta relación se regula por señalización celular donde actúan proteínas como la cinasa R que en condiciones óptimas provoca un aumento de la actividad de c-MYC el cual es un protooncogén que se encuentra expresado en células con una alta tasa proliferativa. c-MYC está encargado de la regulación de la expresión de los factores de transcripción eIF2 α y eIF4E que incrementan la transcripción de p30. En condiciones desfavorables en el medio, se fomenta la disminución de la actividad de c-MYC, produciéndose una disminución de la actividad de los factores de transcripción eIF2 α y eIF4E, lo que lleva a que se transcriba p42, la cual es responsable de la diferenciación celular. Este balance permite regular el funcionamiento normal de las células hematopoyéticas, ya que funciona como un interruptor para dar paso a la proliferación y maduración celular.

Alteraciones en el balance p42/p30, se ha visto que puede estar relacionado con una o varias mutaciones que afecten CEBP α , generando proteínas de forma truncada y causando un proceso leucomogénico (Koschmieder, Halmos, Levantini & Tenen, 2009; Pabst & Mueller, 2014; Leroy et al., 2005).

2.3. CEBP α EN OTROS TEJIDOS

En la hematopoyesis se conoce bien la implicancia del gen CEBP α , pero también se ha visto que tiene participación en células del tejido adiposo, algunos órganos como hígado y pulmón (Li et al., 2018). Este gen se expresa a niveles relativamente altos en los tejidos que tienen la capacidad de sintetizar y metabolizar los lípidos. En tejido adiposo actúa en conjunto con PPAR para regular la biología del adipocito, ya que trabajan sinérgicamente en la conversión adipogénica, diferenciación de pre-adipocitos en adipocitos maduros (Martínez del Pino et al., 2017). Algunos autores refieren el papel de CEBP α en el hígado, Tao et al (2015) encontraron que este factor de transcripción se expresa principalmente en hepatocitos en hígado normal pero no se expresa en células estrelladas hepáticas responsables de la fibrosis hepática, lo cual se relaciona con la autofagia y sugieren que CEBP α podría desempeñar un papel en la fibrosis hepática. En pulmón, CEBP α se expresa altamente en células alveolares de tipo II y macrófagos alveolares, en donde participa en la regulación de la diferenciación y la maduración pulmonar, aunque el mecanismo molecular es poco conocido, sin embargo, se relaciona con la activación de CEBP α está relacionada con la transcripción de varios genes involucrados con la diferenciación específica en pulmón. Estudios recientes indican que la expresión de CEBP α tiene implicancia en la maduración pulmonar y surfactante pulmonar. Se ha establecido la relación de este gen con el adenocarcinoma de pulmón, en el cual se presenta una expresión disminuida, un serie de ensayos han señalado que la sobreexpresión de CEBP α suprime la invasión y migración de células de adenocarcinoma de pulmón (Lu et al., 2017).

2.4. MUTACIONES EN EL GEN CEBP α

Se conoce que existen tres sitios de mutaciones en el gen CEBP α . Estas mutaciones pueden ocurrir en regiones N-terminal, media y C-terminal, y son del tipo puntuales (figura 1) (Satoshi et al., 2022). La mayoría de los pacientes poseen dos mutaciones en CEBP α , una mutación que bloquea la transcripción de p42 y otra en la región bZIP, las que se asocia a un pronóstico favorable (mayor sobrevida) (Matsuo et al., 2015). También se han identificado casos de Leucemia donde se silencia la expresión de CEBP α a través de hipermetilación del promotor como también por inhibición de la traducción del ARNm dónde se encuentra relacionado BCR-ABL (Perea, 2011). Las mutaciones de CEBP α se encuentran con mayor frecuencia en la LMA subtipo M1 o M2 y en aquellos con citogenética de riesgo intermedio como M4. Estas mutaciones son muy variables y pueden ocurrir en toda la región de codificación del gen; la mayoría de los casos de CEPB α con doble mutación, albergan una mutación truncante en la región N-terminal de la proteína combinada con una mutación de cambio de marco de lectura en la región C-terminal. Las mutaciones únicas se distribuyen en toda la región de codificación, con una mayor porción en la región media del gen. Las mutaciones N-terminales son predominantemente inserciones o deleciones (89%) o mutaciones sin sentido (10%), las cuales predicen el truncamiento de la proteína p42, las mutaciones de la región media son en su mayoría pequeñas inserciones o eliminaciones que producen desplazamiento de marco de lectura (86%) o mutaciones sin sentido (14%) que predicen una proteínas p42 y p30 truncada y las mutaciones de la región C-terminal son

predominantemente inserciones o deleciones (67%) o mutaciones sin sentido (21%) que afectan la unión a ADN (Behdad et al., 2015).

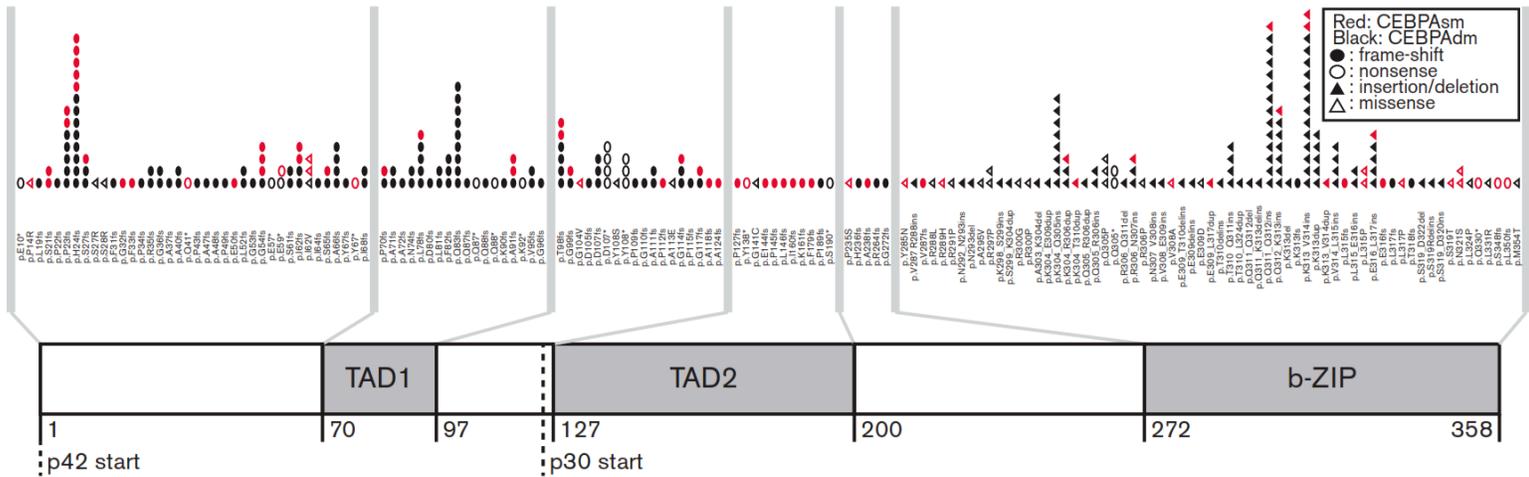


Figura 1. Distribución de las mutaciones y variantes de CEBP α identificadas. Las ubicaciones de las mutaciones se muestran con respecto a la proteína CEBP α y las regiones funcionales. Se conoce que existen tres sitios de mutaciones en el gen CEBP α , estas pueden ocurrir en regiones codificantes N-terminal (aa 1 a 120), media (aa 121 a 277) y C-terminal (aa 278 a 358) y son del tipo puntuales. Tomada de Satoshi et al., 2022.

2.5. EXPRESIÓN INMUNOFENOTÍPICA DEL GEN CEBP α MUTADO

La mayoría de las LMA con mutaciones en CEBP α , se asocian a un inmunofenotipo HLA-DR + (93%), CD7+ (73%), CD13+, CD14-, CD15+ (100%), CD33+ y CD34+ (93%) donde los blastos tienen características de una LAM M1, M2 o M4 (Akin, Oner, Kurekci & Akar, 2018). La Citometría de Flujo es crucial para la detección de estos blastos

leucémicos con el fin de asignarles un linaje e identificar las características inmunofenotípicas aberrantes que permitan la distinción de poblaciones de blastos anormales de progenitores normales (Chen & Cherian, 2021). La estrecha relación de las mutaciones de CEBP α con el estado leucémico de los pacientes y la concordancia de mutación en la presentación y las muestras de recaída implican que la mutación CEBP α es un marcador potencial para el monitoreo de la Enfermedad Mínima Residual (EMR) y por ende en el caso de pacientes en tratamiento (Liang et al., 2015) es necesario emplear técnicas ultrasensibles que permitan predecir la respuesta a la terapia que ha recibido el paciente, establecer una estratificación de riesgo y con esto establecer si existirá remisión a largo plazo. En estos pacientes, puede reducirse el riesgo de recaída utilizando diferentes estrategias post-remisión que incluyen dosis altas o intermedias de citarabina, pero la respuesta no es igual en todos los pacientes (Perea, 2017).

2.6. ESTUDIOS SOBRE MUTACIONES EN EL GEN CEBP α

Los estudios existentes sobre mutaciones del gen CEBP α en LMA son variados, se destaca principalmente su detección en pacientes con M1 y M2 como en M4 y M5, así como también en pacientes con mielodisplasia en los cuales existe transformación a LMA y viceversa, además de su investigación en otro tipo de Leucemias como en Leucemias Mieloides Crónicas (Koschmieder, Halmos, Levantini & Tenen, 2009; Avellino & Delwel, 2017; Au et al., 2016).

También existen estudios realizados en pacientes que han sido clasificados como de riesgo bajo e intermedio, que a su vez presentan un cariotipo normal o anormal, ya que las mutaciones del gen CEBP α son consideradas como un factor pronóstico, como también mutaciones para NPM1 y FLT3.

Se ha relacionado la mutación en CEBP α con la mutación en FLT3 con una asociación de impacto desfavorable respecto al pronóstico de LMA (Wang, Li & Yu, 2015; Rose et al., 2017). También se ha estudiado el impacto de heredar universalmente mutaciones de los genes de NPM1, FLT3 y CEBP α en líneas germinales lo que conduce a problemas hereditarios, siendo estos encontrados en un 5 al 7% de los pacientes estudiado (Tawana, Drazer & Churpek, 2018).

Es importante conocer esta información con el fin de conocer un nuevo sitio terapéutico, la identificación de estas mutaciones puede ayudar a optimizar los enfoques terapéuticos en estos pacientes (Zhang, Bai & Vance, 2013; Tawana, Drazer & Churpek, 2018).

La presencia en pacientes con LMA del gen CEBP α mutado se atribuye a un pronóstico favorable, específicamente las mutaciones dobles en este gen confieren esta condición, ya que estos pacientes tienen un menor riesgo de recaída, además presentan una mayor supervivencia de casi el 80% luego de 5 años de ser diagnosticada la enfermedad (Pastore et al., 2014; Dufour et al., 2012; Arber et al., 2016). Existen estudios donde se compara el pronóstico de pacientes con CEBP α doblemente mutado versus CEBP α con mutación única, uno de ellos es efectuado en Italia por Mannelli et al (2016) donde según

la supervivencia global del primer grupo, a los 80 meses es de 80% mientras que del segundo grupo es menor al 60 %, aunque con esto no se puede dimensionar si CEBP α con mutación única es de impacto, debido a que se deben comparar con los otros genes mutados que se han establecido como factor pronóstico en LMA. En otras situaciones se ha indagado no solo el impacto de CEBP α mutado, sino que la metilación aberrante del promotor de CEBP α , esto porque en condiciones normales la metilación reprime la transcripción génica, lo que en una condición de mutación genera que no se cumpla esta función, se ha investigado su asociación con CEBP α mutado, donde se ha determinado que estas mutaciones no ocurren juntas y se ha estudiado la supervivencia en los pacientes que presentan metilación distal aberrante en CEBP α donde su pronóstico fue favorable para los pacientes con LMA, sin embargo se necesitan mayores estudios con un número muestral mayor, para ser considerado representativo (Fasan et al., 2013). El estudio de Pastore et al (2014), señala que pacientes con dos mutaciones en CEBP α sobrevivieron significativamente más tiempo en comparación con aquellos con mutación única, donde la supervivencia global fue de 9,6 años frente a 1,7 años respectivamente, también que pacientes con doble mutación con una edad \leq 60 años mostraron un pronóstico favorable con una tasa de supervivencia global a 10 años del 81%. Otro hecho que marcó la diferencia fue que pacientes con doble mutación mostraron una mayor supervivencia libre de recaída 9,4 años versus 1,5 años en pacientes con mutación única (De Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016). Así también un estudio de Behdad et al (2015) en EE.UU con pruebas de 2.393 casos de sospecha de LMA con un ensayo basado en la secuenciación Sanger, proporciona una plataforma de prueba de mutación CEBP α

eficiente y confiable, que permite la detección de todas las mutaciones con una distinción inmediata de casos de mutación única y doble, permitiendo establecer protocolos de tratamiento. En Chile, la guía PANDA (MINSAL, 2013), que es la “guía clínica AUGE de Leucemia en pacientes mayores a 15 años” establece para confirmación diagnóstica el estudio molecular de mutaciones en los genes CEBP α , NMP1 y FLT3, para así definir el riesgo de esta enfermedad, sin embargo en la guía PANDA en pacientes menores de 15 años, este tipo de estudio diagnóstico no es considerado, a pesar de que en esta población se ha dado a conocer un aumento en su incidencia en los últimos años estimándose 7.7 casos por millón de niños de 0 a 14 años en EE.UU (Puumala, Ross, Aplenc & Spector, 2013).

En un análisis retrospectivo de 4708 casos de leucemia mieloide aguda (LMA), Taube et al, evaluaron el impacto de las mutaciones en CEBP α y mostraron que son especialmente las mutaciones en marco de lectura, las que afectan la región básica de la cremallera de leucina (bZIP) de C/EBP α confiriéndoles un resultado favorable, independientemente de su aparición como bialélica (CEBP α bi) o mutación única (CEBP α sm). En comparación con las mutaciones del dominio de transactivación (TAD), este estudio respalda firmemente un papel previamente no definido de CEBP α bZIP, que se refleja en una biología distinta de la enfermedad, que incluye una edad más joven, recuentos de glóbulos blancos más altos, la presencia de mutaciones GATA2 y altas tasas de remisión completa y una mediana larga de supervivencia libre de eventos.

2.7. APORTE CLÍNICO DEL ESTUDIO DEL GEN CEBP α

En Chile no existen estudios que identifiquen mutaciones en pacientes diagnosticados con LMA debutante o en tratamiento, así mucho menos se presentan estudios de prevalencia que doten de una estratificación pronóstica de supervivencia actual, tanto en adultos como en pediátricos. Es sabido que alteraciones genéticas se acompañan de mayor o menor sensibilidad a tratamiento quimioterapéutico como también el riesgo de presentar recidivas, mejorando la calidad de vida al evitar que sufran ansiedad y depresión, toxicidad excesiva durante el tratamiento, agravando la anemia, neutropenia y trombopenia, con menores expectativas de recuperar las cifras normales en caso de responder a la inducción y alcanzar la remisión completa (Baccarani, 2014). La identificación de un genotipo CEBP α proporciona información pronóstica crucial, sin embargo, este impacto pronóstico favorable parece limitarse a los casos con dobles mutaciones de CEBP α y que no se asocian a otras alteraciones genéticas (FLT3-ITD, NPM1) (Liang et al., 2015).

El desarrollo de ensayos de extracción de ADN y PCR para las pruebas de mutación de CEBP α tampoco se han estandarizado debido a que se han visto obstaculizados por la hipercelularidad de las muestras de médula ósea y la presencia de un alto contenido de guanina-citosina (GC), 75%, y de una región de repetición de trinucleótidos en el gen (Behdad et al., 2015).

Debido a que existe un programa de salud pública que aborda la problemática, es que nos planteamos el fijar una técnica de extracción de ADN y comparar su rendimiento con la extracción por columna y por micrométodo, así como también estandarizar la

metodología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en base a la secuencia nucleotídica del gen y empleando diferentes temperaturas de alineamiento (PCR gradiente) como también evaluar el uso de Dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente se propone realizar electroforesis del producto amplificado para evaluar integridad y secuenciar el gen para análisis de mutaciones más prevalentes en pacientes con LMA debutante o con tratamiento en la región del Biobío y relacionarlo con su perfil clínico e inmunofenotipo, todo para dejarlo a disponibilidad y llevarlo de manera protocolizada en los laboratorios del país.

3. SOLUCIÓN PROPUESTA Y APLICABILIDAD DEL ESTUDIO DEL GEN CEBP α

Obtener la secuencia amplificada del gen CEBP α es un desafío a llevar a cabo, ya que la implementación generalizada de las pruebas se ve obstaculizada por desafíos técnicos, esto conlleva a que se requiere fijar una técnica de extracción de ADN y estandarizar la metodología de PCR, que analizaremos en los puntos siguientes.

3.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DESDE SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA

Uno de los elementos críticos para realizar estudios moleculares es la extracción de ácidos nucleicos (Inglis, Pappas, Resende & Grattapaglia, 2018). Debido a que la LMA

debutante se presenta con leucocitosis en sangre periférica y con hiper celularidad en médula ósea, es necesario realizar diferentes diluciones para optimizar la muestra y lograr obtener una gran cantidad de ADN (Fuentes, 2015). Para lograr este punto estudiaremos las siguientes técnicas: la extracción de ADN por columna y el micrométodo. La primera se basa en la unión del ADN a una matriz inorgánica, generalmente sílice y se estudiará la técnica convencional por lisis con enzima como también con un paso adicional que requiere del uso de perlas magnéticas cargadas positivamente para facilitar la ruptura de la membrana celular y posterior unión al ADN (Baena, Ramos, Gómez & Gómez, 2013; Alejos, Aragón & Cornejo, 2010). La segunda, consiste en tratar previamente la muestra con una sustancia que produce lisis celular, donde la fase superior presenta el ADN, y en la inferior se depositan los restos orgánicos de las células, conseguido mediante la precipitación con alcoholes y que además permiten concentrar el material genético obtenido (Ríos, 2016).

Se utilizarán estas técnicas para evaluar el rendimiento y reproducibilidad en cuanto a cantidad de ADN recuperado, concentración de ADN, pureza, costo, tiempo, con el fin de realizar la PCR y electroforesis y evaluar la integridad mediante la resolución de bandas.

3.2. PCR CONVENCIONAL PARA AMPLIFICAR EL GEN CEBPA

La PCR es una metodología que permite la amplificación de la secuencia de un fragmento de ADN, donde es necesario conocer, al menos parcialmente, la secuencia a amplificar del gen que se estudiará para obtener un gran número de copias a partir de

una pequeña muestra de ADN (Garibyan & Avashia, 2013). Comparada con los métodos tradicionales de amplificación y clonación por técnicas de ADN recombinante, los cuales a menudo toman días, la PCR requiere sólo unas pocas horas (Neidler, 2017). Es necesario estandarizar la PCR convencional debido a un alto contenido de GC del gen CEBP α (75%) y la presencia de una región de repetición de trinucleótidos, ya que pueden interferir en el proceso de hibridación (Behdad et al., 2015). Las secuencias ricas en GC son más estables que aquellas con menor contenido y tienden a formar estructuras secundarias denominadas bucles, como consecuencia, son difíciles de separar durante la desnaturalización del proceso, requiriendo de un aumento en la temperatura para lograrlo. En base a ello, es sugerido el uso de DMSO para contribuir a la interrupción de bucles, facilitando de esta forma la separación de la doble hebra de ADN, así como también el uso de diferentes temperaturas de alineamiento en la PCR por gradiente (Neidler, 2017). Por otra parte, debido a la presencia de una región de repetición de trinucleótidos antes mencionada, se propone como solución, el uso de un solo partidador, en lugar de dos o tres que recomiendan algunos autores como Behdad et al (2015), utilizando dos diferentes mezclas y cantidades de partidores para hacer comparaciones y validar la técnica. Así se obtendrán resultados más específicos una vez realizada la electroforesis en matriz sólida de agarosa, preferida para separar los ácidos nucleicos, pues da una capacidad de separación adecuada que puede ser flexibilizada con la concentración utilizada. Esta técnica es accesible debido a su bajo costo, a la diversidad de diseños de cámaras y a que es fácil de preparar (Peña, Ramírez & Barrera, 2013).

La PCR convencional es una técnica simple de entender, usar y es altamente sensible (Garibyan & Avashia, 2013). Es una metodología de bajo costo y asequible en laboratorios, en comparación a otras metodologías similares como la qPCR, definida como el estándar de oro al cuantificar fragmentos y también poseer una alta sensibilidad, que podría considerarse como una opción al usar muestras de ADN, pero actualmente los altos costos de los equipos y estuches comerciales de qPCR pueden ser el principal inconveniente para su implementación en países en desarrollo (Hickman, 2018). Así como el trabajo con RT-PCR que requiere el uso de ARN y por ello de una retrotranscriptasa, enzima cuya función es convertir ARN monocatenario en ADN y que es importante al ser usado en la detección de translocaciones y mutaciones, en un tiempo corto y de bajo presupuesto, pero que tiene la desventaja de trabajar con ARN, que representa una mayor complejidad al ser una molécula poco estable y de fácil degradación por ARNasas, es debido a esto que es necesaria una técnica complementaria que prefiera trabajar con ADN genómico (Kotwal, Manoj & Kapoor, 2017). La metodología de PCR no es suficiente para la detección de una mutación en un gen, siendo necesaria la secuenciación.

3.3. SECUENCIACIÓN SANGER PARA ESTUDIO DE MUTACIONES DEL GEN CEBP α

La secuenciación permite identificar con exactitud en qué nucleótido es producido algún tipo de alteración (Van Dijk, Jaszczyszyn, Naquin & Thermes, 2018). Específicamente, la secuenciación de Sanger ha sido ocupada ampliamente desde hace

décadas, ya que permite descifrar secuencias completas de ADN sin la necesidad del ensamblaje de transcritos secuenciados (Peña, Ramírez & Barrera, 2013).

3.4. ANÁLISIS DE MUTACIONES EN GEN CEBP α

La identificación del inmunofenotipo de los blastos leucémicos a través de la Citometría de flujo es una herramienta muy útil y juega un papel importante a la hora de establecer el diagnóstico de leucemia, con este método se puede distinguir eficazmente entre poblaciones de células neoplásicas y poblaciones de células normales/reactivas, asignar el linaje y, caracterizar el genotipo y fenotipo asociados a la leucemia (Li, 2022). Por lo mismo, y dado que no existe un único marcador característico para los distintos tipos de leucemia, es que se han creado sistemas de puntuación a partir de un panel inmunofenotípico compuesto que incluye diferentes marcadores, como es en el caso de la Leucemia linfática crónica (LLC) con la puntuación de Matutes, la cual permite diferenciarla de otras neoplasias linfoides de células B maduras y que ha demostrado tener una alta especificidad y sensibilidad a la hora del diagnóstico diferencial (D'Arena et al., 2018).

Además, el sistema de puntuación inmunofenotípica puede ser utilizado para identificar y predecir algunos reordenamientos comunes de la Leucemia linfoblástica aguda tipo B (LLA-B) como ETV6/RUNX1, BCR/ABL1, reordenamientos del gen KMT2A y TCF3/PBX1, producidos por, respectivamente, t(12;21)(p13;q22), t(9;22)(q34;q11), translocaciones que involucran la región 11q23 y t(1;19)(q23;p13), donde se ha visto que

la utilización de paneles específicos permite correlacionar características inmunofenotípicas específicas de la enfermedad con la categoría citogenética, que involucra los reordenamientos cromosómicos mencionados anteriormente. Así mismo, los valores de especificidad y sensibilidad para cada puntuación predictiva fueron 89,29 % y 96,15 % para t(12;21); 75,00 % y 88,19 % para t(9;22); 84,21 % y 99,04 % para t(11q23), y 85,71% y 92,71% para t(1;19), demostrando que los puntajes propuestos son altamente específicos y significativamente sensibles, lo que ayuda finalmente a una investigación citogenética mejor dirigida y, por lo tanto, a una práctica de laboratorio más rentable, ya que este método requiere de menos trabajo y entrega resultados en menor tiempo en comparación a otras técnicas como la secuenciación, sobre todo en un contexto de rutina. De esta forma permite disminuir el tiempo de diagnóstico y por consiguiente, el costo de este (Tsagarakis et al., 2019).

En el caso de Leucemia mieloide aguda (LMA), de igual forma se ha demostrado la correlación entre la expresión combinada de antígenos de superficie y la presencia de algunas anomalías cromosómicas o moleculares recurrentes, como la de CEBP α -dm que, a pesar de existir métodos de cribado molecular para su detección, estos presentan una serie de dificultades ya sea por características intrínsecas del gen o por problemas técnicos. Las dificultades mencionadas anteriormente pueden ser superadas utilizando métodos de detección temprana basados en un perfil inmunofenotípico de la LMA con mutación CEBP α -dm, puesto que posee una menor complejidad, alta disponibilidad y rapidez en la obtención de resultados útiles para el médico tratante, mejorando así las

condiciones del paciente (Mannelli et al., 2017), lo cual es relevante a la hora de la caracterización de la leucemia, ya que, proporciona información pronóstica crucial en cuanto al riesgo de recaída del paciente.

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, es que se ha creado un sistema de puntuación inmunofenotípica para identificar pacientes con LMA con mutación CEBP α -dm, la cual se basa en una combinación de 7 marcadores de superficie, a los que se le asigna un punto para cada expresión de HLA DR, CD7, CD13, CD15, CD33, CD34 y un punto para falta de expresión de CD14, en donde se ha demostrado que los pacientes con una puntuación superior a 5 poseen un valor predictivo positivo (VPP) del 50%, mientras que los pacientes con una puntuación inferior a 6 poseen un valor predictivo negativo (VPN) del 100%, en donde la probabilidad de poseer CEBP α -dm aumentaba si, dentro de la expresión, se incluía CD7 (Marcolin et al., 2019). Estos resultados son relevantes a la hora de diagnosticar a pacientes con CEBP α -dm, pero resulta ser más útil para identificar pacientes con LMA sin probabilidad de tener esta mutación dado su VPN muy alto, por lo que una estrategia de detección basada en la puntuación de C CEBP α -dm puede asegurar un menor riesgo en omitir a pacientes con LMA con esta mutación y permite tener una visión más dirigida para seleccionar a aquellos pacientes que necesiten secuenciar el gen CEBP α , lo que proporciona información pronóstica de respuesta al tratamiento y su relación con el riesgo de recaída que puede estar disponible rápidamente. Esto es debido a que, al comparar el análisis inmunofenotípico a través de la citometría de flujo con otros métodos moleculares y

estudios citogenéticos como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de siguiente generación (NGS), éste posee varias ventajas sobre ellos. A modo de ejemplo, la citometría de flujo suele tener un tiempo más acotado de entrega de resultados, teniendo el potencial de proporcionarlos a las pocas horas de recolección de muestra, en comparación a los métodos basados en PCR, que a pesar de tener una alta sensibilidad, estos necesitan del acceso a una muestra de diagnóstico para poder identificar a un marcador clonal y su tiempo de entrega de resultados tarda desde días a semanas (Cherian & Soma, 2021), lo que se traduce en un retraso posiblemente evitable de la identificación de pacientes con LMA con mutación CEBP α -dm, cuya importancia radica en realizar la secuenciación completa de CEBP α acotándola únicamente a casos seleccionados para que se puedan elegir estrategias de tratamiento proporcionales.

4. HIPÓTESIS

El desarrollo de un protocolo de amplificación y secuenciación, permite caracterizar el gen CEBP α en pacientes con leucemia mieloide aguda.

5. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un protocolo de amplificación y secuenciación del gen CEBP α para el estudio molecular de pacientes con leucemia mieloide aguda.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la extracción de ADN desde muestras de sangre periférica y médula ósea, de pacientes normales y pacientes con leucemia mieloide aguda.
2. Amplificar y secuenciar la región codificante del gen CEBP α desde ADN obtenido de sangre periférica y médula ósea, de pacientes normales y con leucemia mieloide aguda.
3. Desarrollar un protocolo de identificación molecular del gen CEBP α en pacientes con leucemia mieloide aguda.

6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 DISEÑO DEL ESTUDIO:

En términos de causalidad, se realizó un estudio de tipo observacional analítico, ya que sólo se estudiaron técnicas de extracción de ADN para obtener un mejor producto y lograr la secuenciación del gen CEBP α para incorporarlo en estudios moleculares y de asociación a perfil clínico e inmunofenotipo futuros. En relación a la clasificación del estudio, se realizó un estudio de cohorte transversal retrospectivo, donde durante el I semestre del 2021 se analizaron 3 muestras de voluntarios sin la patología por medio de un método de muestreo no probabilístico por conveniencia. Luego en el 2022 se estudiaron 10 pacientes con leucemia mieloide aguda.

6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO:

Selección y tamaño de la muestra:

Para este estudio, se realizó la selección de 3 voluntarios sin LMA de la Universidad de Concepción, esto con el propósito de emular una matriz de celularidad normal y otra aumentada, siendo más típico del debut de un paciente con leucemia, para estudios comparativos de técnicas de extracción de ADN y lograr la estandarización de la PCR.

Luego se recolectaron las muestras de 10 pacientes con LAM, donde se obtuvo 4 muestras de médula ósea y 6 de sangre periférica. De los 10 pacientes, 8 eran **LAM** de *novo* y 2 tenían estudio de EMR.

Criterios de inclusión:

Toda persona que deseó ser parte del estudio pudo hacerlo siempre y cuando cumpliera con los siguientes criterios:

- Pacientes con LMA, que sean pacientes debutantes o estén en tratamiento de la patología que incluyan Síndrome Mielodisplásico.
- Voluntarios sin LMA, no fumadores ni bebedores de alcohol, sin enfermedades concomitantes que firmaron el consentimiento informado.
- Pacientes mayores de edad para la legislación chilena, tanto hombres como mujeres.

Criterios de exclusión:

Toda persona que deseó ser parte del estudio pudo hacerlo siempre y cuando no cumpliera con ninguno de estos criterios:

- Pacientes con Leucemia que no presenten LMA (ejemplo LPA).
- Pacientes con LMA que presenten remisión de la enfermedad y que hayan terminado el tratamiento.
- Voluntarios con LMA, con enfermedades concomitantes y/o que no firmaran el consentimiento informado.

6.3 TOMA DE MUESTRA:

Se solicitaron 14 mL de sangre periférica de cada voluntario sano. La toma de muestra de sangre periférica fue realizada en el Laboratorio Docencia de Tecnología Médica de la Universidad de Concepción y almacenada en tubos con anticoagulante EDTA K₃. Posteriormente las muestras fueron transportadas al Laboratorio del edificio de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Concepción para el procesamiento y extracción de ADN para finalmente almacenarlo a 4°C, en alícuotas en tubos eppendorf para posterior uso molecular. La muestra sobrante se eliminó bajo los requerimientos de bioseguridad (MATPEL) una vez terminado el presente proyecto.

De los 14 mL de sangre periférica de cada voluntario, se destinaron 1,8 mL para las técnicas de extracción de ADN por Columna y Sales, donde se emplearon alícuotas de 300 µL de Sangre Completa. 200 µL se usaron para técnica de extracción de ADN por Columna más perlas para estudios de rendimiento con respecto a la técnica de Columna. Los 12 mL restantes de cada voluntario fueron centrifugados en tubos EDTA de 2 mL cada uno a 2.000 rpm por 2 minutos, donde se obtuvo un Concentrado de Leucocitos en cada uno de los 6 tubos, de los cuales se extrajeron alícuotas de 500 µL, donde se llevó a cabo la extracción de ADN por Columna y Sales, esto con el propósito de simular un paciente con LMA.

Los parámetros del hemograma completo de los voluntarios sin LMA, para Concentrado de Leucocitos y Sangre Completa, fueron recolectados a través del software del contador hematológico *Sysmex XS 1000i*, lo que permitió conocer el

recuento de leucocitos y establecer un límite inferior y superior y determinar así la posterior dilución en muestras que se realizarían a futuro en pacientes con LMA.

La recolección de muestras de pacientes con LMA se recolectarán desde el Servicio de Laboratorio Clínico de la sección de Hematología del HGGB.

6.4 EXTRACCIÓN DE ADN POR TÉCNICA DE COLUMNA Y PERLAS

En la extracción por Columna se usó el equipo de extracción *NucleoSpin Blood* con solución de lisis celular con proteinasa K. Se añadió tampón B3 a las muestras para luego mezclar vigorosamente, paso crítico para obtener un alto rendimiento y pureza de ADN, ya que se produce la ruptura celular con la estabilización de los ácidos nucleicos, permitiendo una adsorción selectiva del ADN a la membrana de sílice (Baena, Ramos, Gómez & Gómez, 2013). Para ajustar las condiciones de unión del ADN a la matriz, se añadió etanol 96% a cada muestra. Los inhibidores de la PCR se removieron a través del lavado de la membrana de sílice, mediante dos pasos: un primer lavado con tampón BW y un segundo lavado con tampón B5. Para el posterior secado de la membrana, las columnas fueron centrifugadas en sus respectivos tubos de recolección, lo que permitió que el ADN se adhiriera a la membrana, mientras que los contaminantes pasaron por ella. Finalmente, para la elución del ADN obtenido, se utilizó tampón precalentado a 70°C BE.

Para la alternativa de Columna más perlas, éste se realizó según protocolo de técnica de Columna convencional ya descrito, pero empleando un tubo con perlas, con

el objetivo de facilitar la ruptura de la membrana celular y su posterior unión al ADN. Se utilizó el equipo *Precellys Lysing Kit (bertin technologies)*.

6.5 EXTRACCIÓN DE ADN POR TÉCNICA DE SALES O MICROMÉTODO

Para el procedimiento experimental de extracción de ADN por la técnica de *micrométodo RBAC*, se utilizó yoduro de sodio como agente caotrópico para realizar la lisis celular, por lo que mezcla vigorosa en vortex fue un paso crítico de la técnica. Posteriormente se añadió cloroformo/alcohol isoamílico en la proporción 24:1 para la separación de proteínas y detritus celular, causando formación de fases. La precipitación final y lavado de material genético se consiguió a través del uso de alcoholes (Ríos 2016).

6.6 CUANTIFICACIÓN DEL ADN:

Se llevó a cabo por medio del equipo *NanoQuant Plate™ infinite M200PRO (TECAN)*, donde se evaluó la concentración y pureza de ADN en base a densidad óptica 260/280.

6.7 REPETITIVIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DE LA TÉCNICA:

La repetitividad de las técnicas se llevó a cabo mediante análisis estadístico de variabilidad. La reproducibilidad de las técnicas se llevó a cabo en triplicados, realizando duplicados el día de la toma de muestra con su medición en equipo y la siguiente medición al paso de una semana.

6.8 ESTANDARIZACIÓN DE METODOLOGÍA DE PCR CONVENCIONAL:

Para muestras de ADN genómico, se utilizó el inserto *GoTaq Green Master Mix* modificado de 25 μ L por mezcla. Se emplearon 6 juegos de partidores (ver tabla 1), tanto partidor sentido como partidores antisentido para una concentración final de 10 μ M (ver anexo 6).

Tabla 1. Partidores sentido y antisentido con su composición nucleotídica para PCR gradiente.

Partidor	Oligonucleótidos
Sentido CEBP α P3F1	5'-TCGCCATGCCGGGAGAACTC-3'
Sentido CEBP α PP1F	5'-TCGCCATGCCGGGAGAACTCTAAC-3'
Sentido CEBP α PP2F	5'-CCGCTGGTGATCAAGCAGGA-3'
Antisentido CEBP α PR1	5'-CCGCCTGGCCCCCTCATCT-3'
Antisentido CEBP α P4 R2	5'-AGATCCGGCGACCCCAAACC-3'
Antisentido CEBP α PP2R	5'-CACGGTCTGGGCAAGCCTCGAGAT-3'
Antisentido CEBP α PP1R	5'-CTGGTAAGGGAAGAGGCCGGCCAG-3'

Se realizó la mezcla de los componentes de la PCR en 72 tubos (ver anexo 7), con triplicados de mezclas de partidores para 3 condiciones diferentes: sin DMSO, DMSO 3% y DMSO 8%, y cada uno para tres temperaturas de alineamiento diferentes, incluyendo su respectivo control negativo.

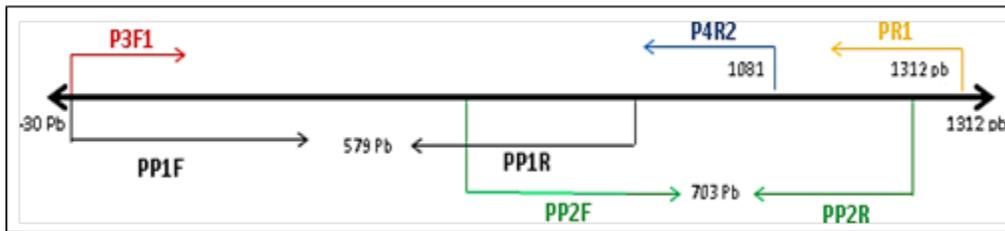


Figura 2. Tamaño de amplicones en pares de bases (pb) con sus respectivos partidores sentido y antisentido. Se realizan pruebas de partidores sentido y antisentido publicados y otros creados, aumentando la posibilidad de amplificar la región codificante del gen CEBPA.

Las 6 mezclas de partidores fueron seleccionadas dependiendo de su temperatura de hibridación a la hebra de ADN como: PP1F y PP1R, PP2F y PP2R, P3F1 y P4R2, P3F1 y PR1, PP1F y P4R2, PP1F y PR2R (Figura 2).

Inicialmente se añadió la enzima Taq polimerasa, agua molecular y luego a cada tubo PCR se les añadió templado a una concentración final de 100 ng/ μ L. Posteriormente se realizó la PCR gradiente a partir del protocolo inicial (modificado) (ver tabla 2 y 3).

Tabla 2. PCR gradiente modificada. Se muestran las etapas, temperaturas, tiempo y ciclos de reacción.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Denaturación inicial	95°C	3 minutos	1
Denaturación	95°C	35 segundos	30
Alineamiento	60, 62, 64°C	30 segundos	
Extensión	72°C	35 segundos	
Extensión final	72°C	7 minutos	1

Tabla 3. Par de Partidores usados con el tamaño de amplicón generado.

Par de partidores	Tamaño del amplicón	Par de partidores	Tamaño del amplicón
PP1F + PP1R	579 pb	P3F1 + PR1	1312 pb
PP2F + PP2R	703 pb	PP1F + P4R2	1081 pb
P3F1 + P4R2	1081 pb	PP1F + PP2R	1201 pb

6.9 INTEGRIDAD DEL ADN Y ESPECIFICIDAD/TAMAÑO DEL AMPLICÓN

La integridad del ADN genómico y la especificidad/tamaño del amplicón se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se sometieron a un campo eléctrico de 60 voltios por 40 minutos y 2 horas, respectivamente.

6.10 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PRC EN GELES DE AGAROSA

Se tomaron 100 µl de producto de PCR para cada muestra y las bandas fueron visualizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, utilizando bromuro de etidio (BrEt) como revelador. Se utilizó un marcador de pares de base

AccuRuler 1kpb DNA RTU Ladder (Maestrogen) para observar las bandas a la altura esperada. En corrida de electroforesis se realizó por 3 horas, a 60 *Volts* y 250 *mA*.

6.11 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Se cortó el gel que contenía el fragmento de ADN con un bisturí estéril. Cada fragmento de ADN se depositó en un eppendorf de 2 mL estéril (previamente pesado y rotulado). Luego se pesó el gel para estimar el volumen de buffer de unión a agregar. Se adicionó un volumen de buffer de unión a la porción 1:1 con gel (volumen:peso). Se incubó la solución a 55°C (Thermo Block Dlab), mezclando el tubo por inversión cada 2 minutos para facilitar el proceso de fusión. Una vez que el gel estuvo completamente disuelto se hizo vortex breve a la mezcla antes de cargar en la columna. Los 800 µl de la solución del gel solubilizado fueron transferidos a la columna de purificación GeneJET y centrifugado (Centrífuga Minispin de Eppendorf) durante 60s, a 13400 rpm. Luego se colocó la columna de nuevo en el mismo tubo de recolección. Se agregaron 100 µl de buffer de unión a la columna de purificación. Luego se centrifugó durante 60s, a 13400 rpm y se colocó un nuevo tubo de recolección. Se agregaron 700 µl de tampón de lavado (diluido en etanol al 100%), se centrifugó durante 60s, a 13400 rpm. Finalmente, se centrifugó la columna vacía durante 60s, a 13400 rpm para eliminar completamente el tampón de lavado residual.

Se transfirió la columna a un tubo microcentrífuga de 1,5 mL estéril. Se agregaron 20 µl de agua libre de ARN y ADNasas, se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y luego se centrifugó durante 60s a 13400 rpm. Por último, se volvió a centrifugar por 60s a 13400 rpm y se almacenó el ADN purificado a - 20°C.

6.12 SECUENCIACIÓN

Para el envío de las muestras se prepararon tubos con 100 μL de producto de PCR purificado. Además de los partidores en un volumen final de 50 μL a una concentración de 10 pmol/ μl . El servicio de secuenciación de electroforesis capilar (Sanger) fue solicitado a la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las muestras fueron procesadas en un ABI PRISM 3500 xl Applied Biosystems. Equipo fue adquirido a través de un proyecto: CONICYT – FONDEQUIP EQM150077

7 PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva cuantitativa para determinar las medias y desviaciones estándar de los resultados obtenidos en la extracción de ADN en base a las variables dependientes: concentración de ADN y pureza y variables independientes: número de voluntarios, tipo de método extracción ADN y tipo de muestra. Se utilizó estadística descriptiva para la integridad del ADN como la comparación de costos y tiempos. Posteriormente se empleó estadística inferencial para comparar analíticamente los resultados entre las tres técnicas de extracción por medio de la prueba t-student a través del programa *GraphPad Prism* para su análisis, y así establecer si hubo diferencias estadísticamente significativas. Para determinar si existieron diferencias en la metodología de la PCR, se analizó mediante el proceso electroforético la resolución de bandas íntegras, consideradas como óptimas, mientras que aquellas que mostraron cierto grado de desintegración, fueron catalogadas como no óptimas.

8 RESULTADOS:

8.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ADN GENOMICO DE SANGRE COMPLETA Y CONCENTRADO DE LEUCOCITOS

Debido a las complicaciones que presenta la extracción de ADN de pacientes con leucemia, teniendo en cuenta que los recuentos son extremadamente variables, con tendencia a la hiperleucocitosis (recuento de leucocitos $>100 \times 10^3/\mu\text{L}$), principalmente en pacientes debutantes, como también leucopenias graves (recuento de leucocitos $<1 \times 10^3/\mu\text{L}$), luego del tratamiento de inducción y/o consolidación, se requiere estandarizar la técnica que permita obtener una suficiente concentración de material genético, integro y puro, para poder realizar las técnicas moleculares y amplificar los distintos genes de interés clínicos. Se utilizó sangre periférica con recuentos normales de leucocitos ya que una de las matrices usadas para el estudio del paciente con leucemia es la sangre venosa total. También se realizó una centrifugación de muestras normales, para generar una concentración de leucocitos y extraer el buffy-coat emulando una muestra con mayor celularidad equivalente a la matriz de una médula ósea, como un segundo tipo de muestra utilizada para estudios moleculares bajo el contexto leucémico.

Se reclutaron a 3 pacientes sanos, de los cuales se obtuvo sangre completa anticoagulada con EDTA K₃, cuyas muestras fueron procesadas en el contador Sysmex xs10001, para obtener el recuento de leucocitos de cada uno de ellos. Luego se realizó una centrifugación a 3000rpm durante 5 minutos, para generar una concentración de

leucocitos en la fase media de la muestra, la que fue aspirada obteniendo una muestra de 300 μL concentrada, siendo procesada en el contador antes mencionado, obteniendo un considerable aumento del recuento de eritrocitos, plaquetas y leucocitos (Tabla 4).

Tabla 4. Recuento de Leucocitos desde Sangre Completa y desde Concentrado mediante centrifugación.

Voluntario	Recuento de Leucocitos Sangre Completa	Recuento de Leucocitos Concentrado de Sangre Completa
1	9,13 x10e3/ μL	23,69 x10e3/ μL
2	6,79 x10e3/ μL	22,85 x10e3/ μL
3	4,70 x10e3/ μL	11,64 x10e3/ μL

Para generar la lisis de leucocitos y liberar el material genético, se aplicó la técnica de *Precellys Lysing Kit* que, a través de la acción mecánica, permite romper las membranas de estas células (revisar Anexo 4). Esta técnica se aplicó a una muestra concentrada y se evaluó la cantidad, la pureza y la integridad del ADN (Tabla 5).

Tabla 5. Extracción de ADN de Concentrado de Leucocitos por técnica de Columna más Perlas.

Tipo de muestra	Concentrado de Leucocitos		
Técnica	Columna más Perlas		
Voluntario	1	2	3
[ADN] (ng/ μL)	5,3	2,8	18,7
Pureza	2,3	2,0	1,99
Integridad	+	-	-

Se aplican dos técnicas para la extracción de ADN. Una de ellas es por Micrométodo (*RBAC*) o también llamado método de sales (revisar Anexo 5), y el otro método es por columna (*NucleoSpin Blood*) (revisar Anexo 3). Se utilizó como matriz, muestras de concentrado de leucocitos y sangre completa, para comparar cada método de extracción de ADN y evaluar cual presenta mayor rendimiento considerando concentración de ADN obtenido, pureza e integridad del material genético (Tabla 6 y 7).

Utilizando concentrado de leucocitos como matriz, se registra la concentración de ADN en ng/ μ L, pureza e integridad del material genético a través de la visualización de una banda en gel agarosa 1% (+: óptimo, -: no óptimo) (ver anexo 9), obtenidos luego de la extracción. Las variables aplicadas son las técnicas de extracción por sales y columna. Se genera un numero correlativo de 1 a 3 para indentificar a cada individuo, donde se le asignó una letra correspondiente al duplicado indentificadas como a y b. Luego de una semana, se aplicó la extracción a la misma muestra previamente alicuotada, utilizando las mismas técnicas antes mencionadas, para obtener datos de reproducibilidad, cuyo resultado está representado con la letra r (Tabla 6). Utilizando sangre completa como matriz, se registra la concentración de ADN en ng/ μ L, pureza e integridad del material genético a través de la visualización de una banda en gel agarosa 1% (+: óptimo, -: no óptimo) (ver anexo 9), obtenidos luego de la extracción. Las variables aplicadas son las técnicas de extracción por sales y columna. Se genera un numero correlativo de 1 a 3 para indentificar a cada individuo, donde se le asignó una letra correspondiente al duplicado indentificadas como a y b. Luego de una semana, se aplicó la extracción a la misma muestra previamente alicuotada, utilizando las mismas técnicas antes

mencionadas, para obtener datos de reproducibilidad, cuyo resultado está representado con la letra r (Tabla 7).

Tabla 6. Extracción de ADN de concentrado de leucocitos por las técnicas de extracción de sales y columna.

Tipo de muestra	Concentrado de Leucocitos																	
Técnica	Sales									Columna								
Voluntario	1			2			3			1			2			3		
N° muestra	1a	1b	1r	2a	2b	2r	3a	3b	3r	1a	1b	1r	2a	2b	2r	3a	3b	3r
[ADN] (ng/ μL)	276,4	379,5	269,1	278,2	338,4	107,0	194,5	147,5	289,2	47,1	30,1	67,4	25,5	90,9	59,1	67,6	125,4	97,3
Pureza	1,78	1,75	1,75	1,85	1,77	1,92	1,91	1,84	1,78	1,92	1,92	1,90	1,11	1,77	1,87	1,90	1,84	1,86
Integridad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

Tabla 7. Extracción de ADN de sangre completa por las técnicas de extracción sales y columna.

Tipo de muestra	Sangre Completa																	
Técnica	Sales									Columna								
Voluntario	1			2			3			1			2			3		
N° muestra	1a	1b	1r	2a	2b	2r	3a	3b	3r	1a	1b	1r	2a	2b	2r	3a	3b	3r
[ADN] (ng/uL)	186,0	157,5	85,2	192,1	233,8	166,6	317,5	294,8	119,8	38,2	42,9	30,8	94,9	36,7	36,3	59,4	11,1	29,8
Pureza	2,05	1,95	1,79	1,93	1,94	1,93	1,81	1,94	1,72	1,74	1,30	0,97	0,91	1,31	1,69	1,59	1,74	1,44
Integridad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Para obtener resultados concluyentes, y saber que método de extracción de ADN es mejor en cada tipo de matriz utilizada (sangre total o concentrado de leucocitos), se aplicó un análisis estadístico comparativo para evaluar significancias estadísticas.

Primero se realizó la comparación entre las técnicas de extracción de ADN aplicando el método de columna directa y el de columna con lisis previa de membranas a través de perlas, donde los resultados muestran una significancia estadística en la concentración de ADN, pero no en la determinación de la pureza (Figura 3 y 4).

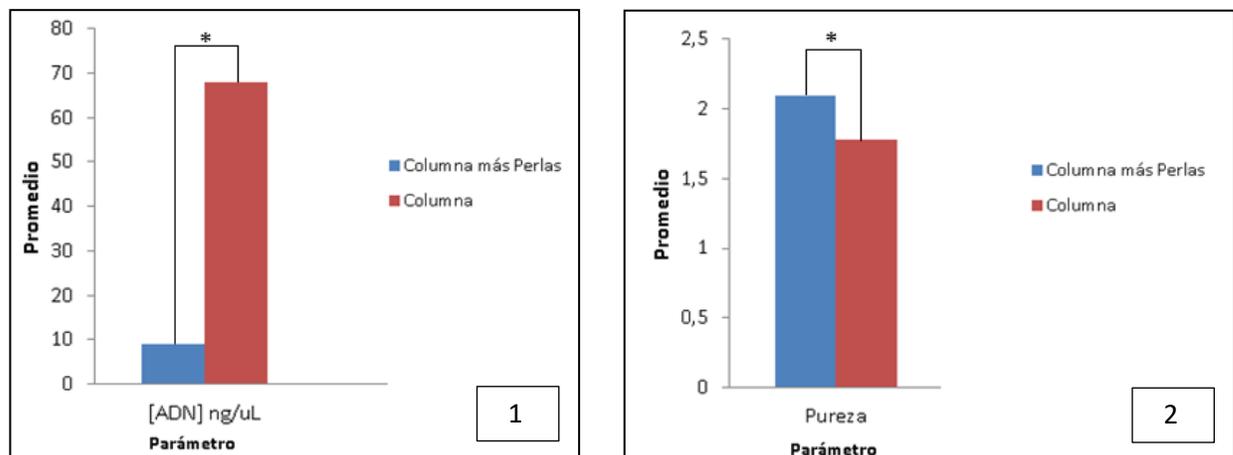


Figura 3. Comparación de extracción de ADN entre las técnicas por Columna más Perlas versus Columna. Para la primera comparación entre las técnicas, se utiliza la concentración de ADN, donde se obtiene un $*p$: 0,0130, representando una diferencia estadísticamente significativa. Para la segunda comparación entre las técnicas, se utiliza la pureza del ADN, donde se obtiene un $*p$: 0,0871, representando una diferencia que no es considerada estadísticamente significativa.

Luego se realizó la comparación entre las matrices sangre total y concentrado de leucocitos, aplicando el método de extracción de ADN por sales, donde los resultados no muestran una significancia estadística en la concentración de ADN ni tampoco en la determinación de la pureza (Grafico 3 y 4).

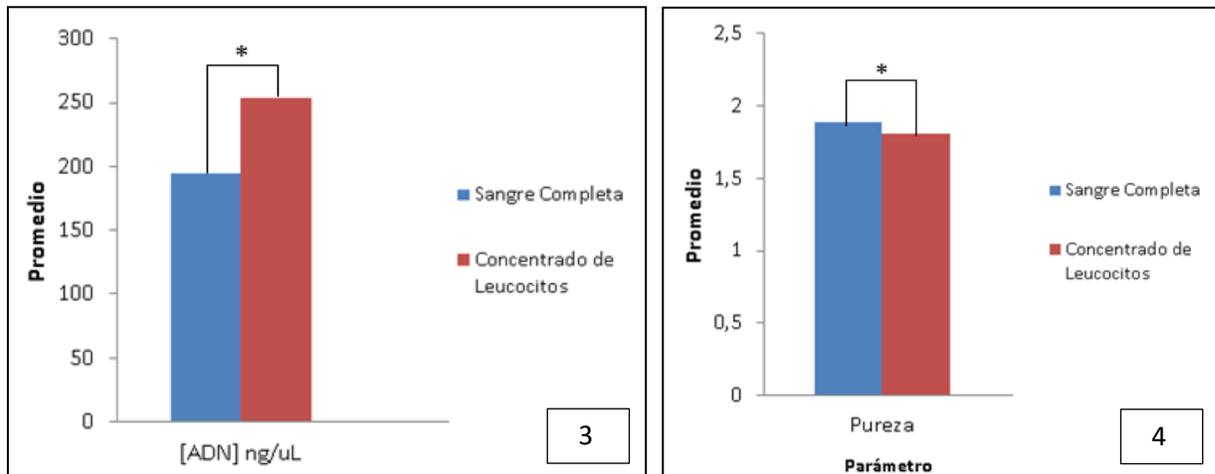


Figura 4. Comparación de extracción de ADN a través del método de sales entre las matrices sangre total y concentrado de leucocitos. Para la primera comparación entre las matrices, se utiliza la concentración de ADN, donde se obtiene un $*p: 0,1507$, representando una diferencia que no es estadísticamente significativa. Para la segunda comparación entre las matrices, se utiliza la pureza del ADN, donde se obtiene un $*p: 0,0683$, representando una diferencia que no es considerada estadísticamente significativa.

A continuación, se realizó la comparación entre las matrices de sangre total y concentrado de leucocitos, aplicando el método de extracción de ADN por columna, donde los resultados muestran una diferencia estadística significativa en la concentración de ADN, pero no en la determinación de la pureza (Figura 5).

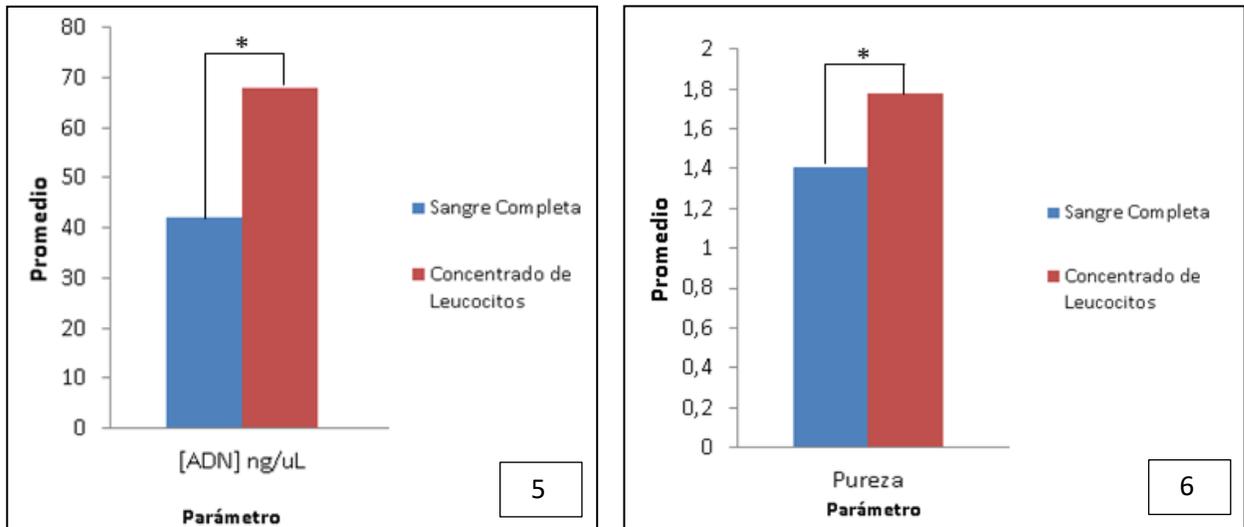


Figura 5. Comparación de extracción de ADN a través del método de columna entre las matrices sangre total y concentrado de leucocitos. Para la primera comparación entre las matrices, se utiliza la concentración de ADN, donde se obtiene un $*p: 0,0134$ representando una diferencia que es estadísticamente significativa. Para la segunda comparación entre las matrices, se utiliza la pureza del ADN, donde se obtiene un $*p: 0,0734$, representando una diferencia que no es considerada estadísticamente significativa.

Posteriormente, se realizó la comparación entre las técnicas de extracción de ADN aplicando el método de sales y el de columna, donde los resultados muestran una significancia estadística en la concentración de ADN, pero no en la determinación de la pureza (Figura 6).

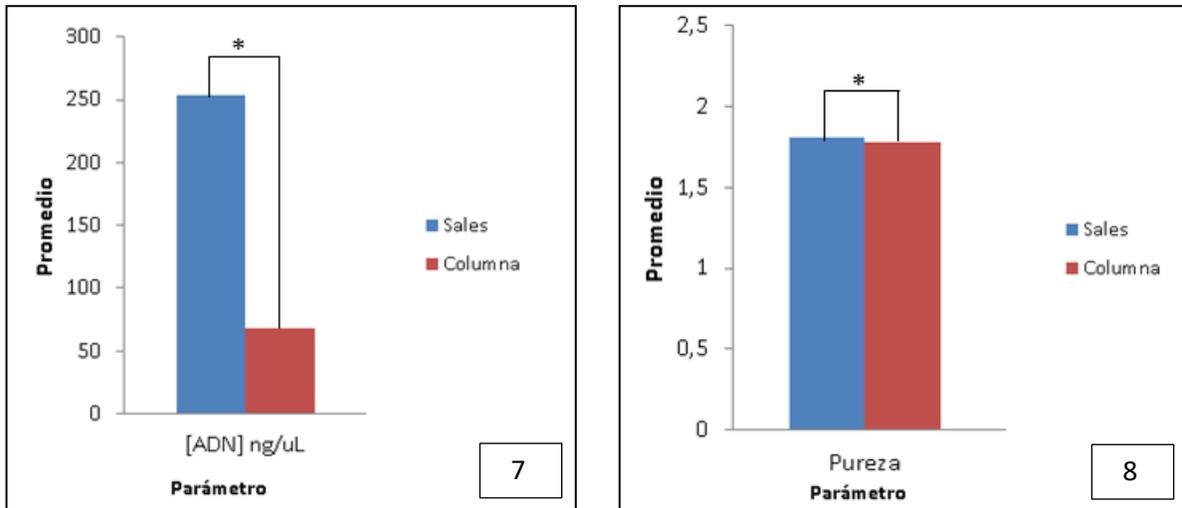


Figura 6. Comparación de extracción de ADN entre las técnicas por sales y Columna. Para la primera comparación entre las técnicas, se utiliza la concentración de ADN, donde se obtiene un $*p: 0,0015$, representando una diferencia estadísticamente significativa. Para la segunda comparación entre las técnicas, se utiliza la pureza del ADN, donde se obtiene un $*p: 0,7595$, representando una diferencia que no es considerada estadísticamente significativa.

8.2 APLICACIÓN DE PCR GRADIENTE PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN CEBP α DESDE MUESTRAS DE INDIVIDUOS SANOS:

Con el objetivo de determinar la programación adecuada para amplificar el gen CEBP α , considerando ciclos, tiempos y temperaturas, se realizó una PCR gradiente, utilizando variaciones en la temperatura de alineamiento de acuerdo a lo recomendado en las fichas de los partidores recibidos, y teniendo en cuenta una alta cantidad de unidades GC, aplicando los ciclos y tiempos publicados por Shih et al (2005), de donde se obtuvieron los juegos de partidores PP1 y PP2. También se aplicó el adyuvante DMSO, de acuerdo al protocolo aplicado en la amplificación del gen CEBP α en el artículo de Marcolin et al., 2019.

Una vez aplicada la PCR gradiente, se obtuvieron bandas de amplificación en todas las combinaciones realizadas de acuerdo a la tabla 3, siempre que se usó DMSO en la mezcla, cuyos resultados se muestran en la Figura 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Tabla 8. Elaboración de 72 mezclas de partidores bajo diferentes condiciones de temperatura de alineamiento y de concentración de DMSO, para realizar PCR gradiente utilizando ADN de pacientes sanos.

DMSO	4x sin DMSO				4X DMSO 3%				4X DMSO 8%			
Temperatura	60°C	62°C	64°C	60°C	60°C	62°C	64°C	62°C	60°C	62°C	64°C	64°C
Mezclas de Partidores	1a3	1a2	1a1	1a (-)	1b3	1b2	1b1	1b (-)	1c3	1c2	1c1	1c (-)
	2a3	2a2	2a1	2a (-)	2b3	2b2	2b1	2b (-)	2c3	2c2	2c1	2c (-)
	3a3	3a2	3a1	3a (-)	3b3	3b2	3b1	3b (-)	3c3	3c2	3c1	3c (-)
	4a3	4a2	4a1	4a (-)	4b3	4b2	4b1	4b (-)	4c3	4c2	4c1	4c (-)
	5a3	5a2	5a1	5a (-)	5b3	5b2	5b1	5b (-)	5c3	5c2	5c1	5c (-)
	6a3	6a2	6a1	6a (-)	6b3	6b2	6b1	6b (-)	6c3	6c2	6c1	5c (-)

Se dan a conocer diferentes mezclas sin DMSO, DMSO al 3% y 8%, bajo 3 diferentes temperaturas de alineamiento para la PCR en base a una mezcla al 5x. Las diferentes mezclas de partidores se rotularon con respecto a la siguiente nomenclatura: el primer número corresponde a la mezcla de partidores (1: PP1F y PP1R; 2: PP2F y PP2R; 3: P3F1 y P4R2; 4: P3F1 y PR1; 5: PP1F y P4R2; 6: PP1F y PP2R), la letra es la concentración de DMSO (a: sin DMSO; b: DMSO al 3%; c: DMSO al 8%), y el siguiente dígito es la temperatura usada (1: 64°C; 2: 62°C; 3: 60°C). (-): control negativo (Tabla 8).

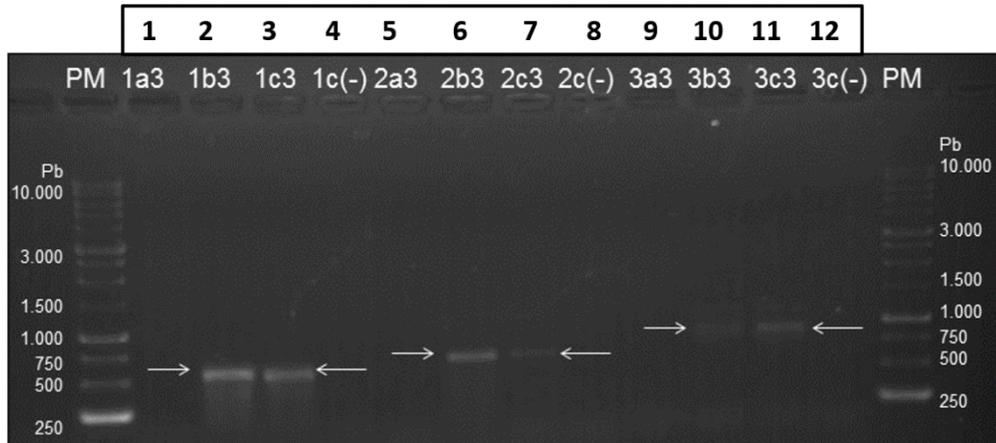


Figura 7. Especificidad y tamaño del amplicón de mezclas 1, 2 y 3 a una temperatura de 60°C. Carril 1, 5 y 9 sin DMSO; carril 2, 6 y 10 con DMSO al 3%, bandas observadas entre los 500-750 pb, 750-1000 pb y 1000-1500 pb, respectivamente ; carril 3, 7 y 11 con DMSO al 8%, bandas observadas entre los 500–750 pb, 750–1000 pb y 1000–1500 pb, respectivamente. (-): control negativo.

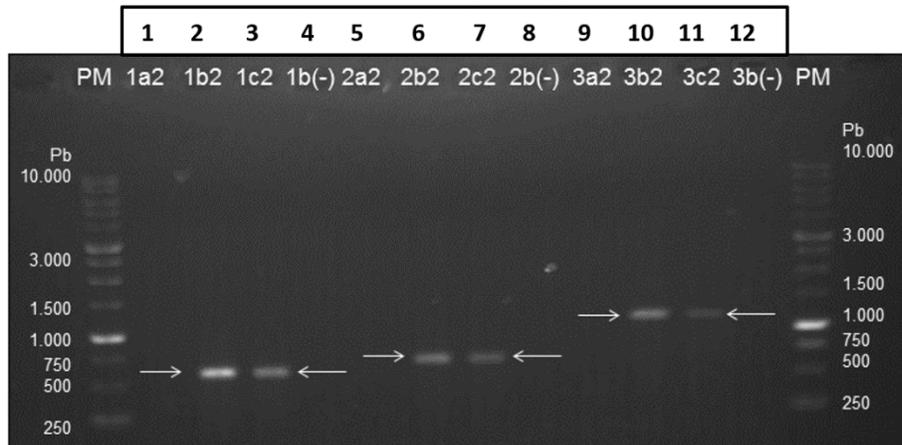


Figura 8. Especificidad y tamaño del amplicón de mezclas 1, 2 y 3 a una temperatura de 62°C. Carril 1, 5 y 9 sin DMSO; carril 2, 6 y 10 con DMSO al 3%, bandas observadas entre los 500-750 pb, 750 pb y 1000- 1500 pb, respectivamente; carril 3, 7 y 11 con DMSO al 8%, bandas observadas entre los 500- 750 pb, 750-1000 pb y 1000-1500pb, respectivamente. (-): control negativo

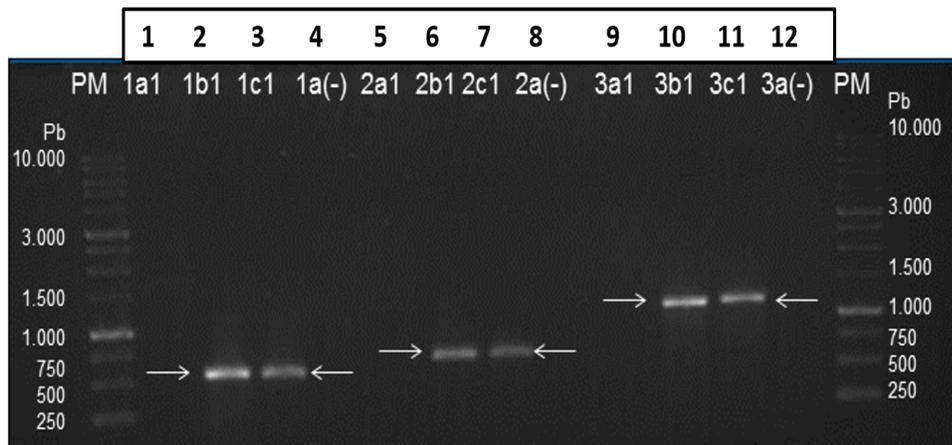


Figura 9. Especificidad y tamaño del amplicón de mezclas 1, 2 y 3 a una temperatura de 64°C. Carril 1, 5 y 9 sin DMSO; carril 2, 6 y 10 con DMSO al 3%, bandas observadas entre los 500-750 pb, 750 pb y 1000- 1500 pb, respectivamente; carril 3, 7 y 11 con DMSO al 8%, bandas observadas entre los 500- 750 pb, 750-1000 pb y 1000-1500pb, respectivamente. (-): control negativo

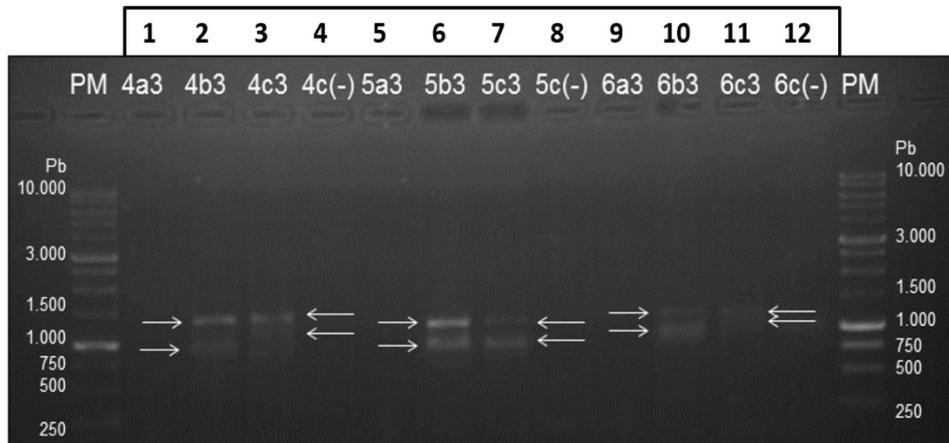


Figura 10. Especificidad y tamaño del amplicón de mezclas 4, 5 Y 6 a una temperatura de 60°C. Carril 1, 5 y 9 sin DMSO; carril 2, 6 y 10 con DMSO al 3%, bandas observadas entre los 500-750 pb, 750-1000 pb y 750-1000 pb, respectivamente; carril 3, 7 y 11 con DMSO al 8%, bandas observadas entre los 500-750 pb, 750-1000 pb y 750-1000 pb, respectivamente. (-): control negativo.

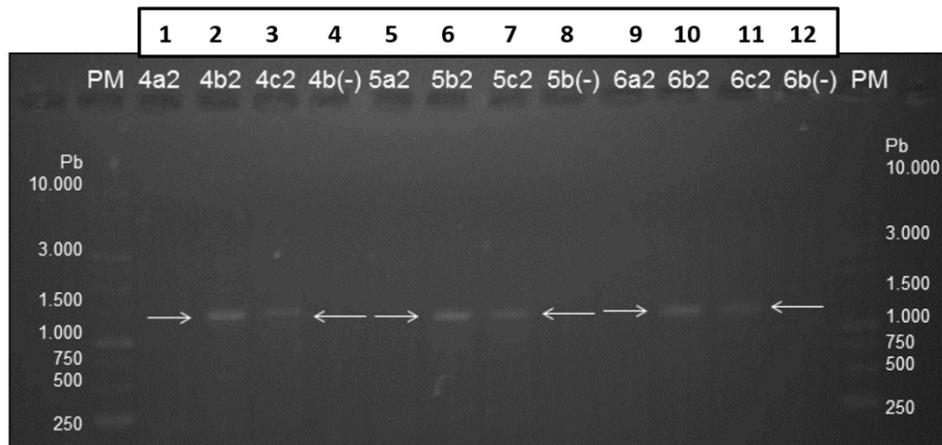


Figura 11. Especificidad y tamaño del amplicón de mezclas 4, 5 y 6 a una temperatura de 62°C. Carril 1, 5 y 9 sin DMSO; carril 2, 6 y 10 con DMSO al 3%, todas las bandas observadas entre los 1000-1500 pb; carril 3, 7 y 11 con DMSO al 8%, todas las bandas observadas entre los 1000-1500 pb. (-): control negativo.

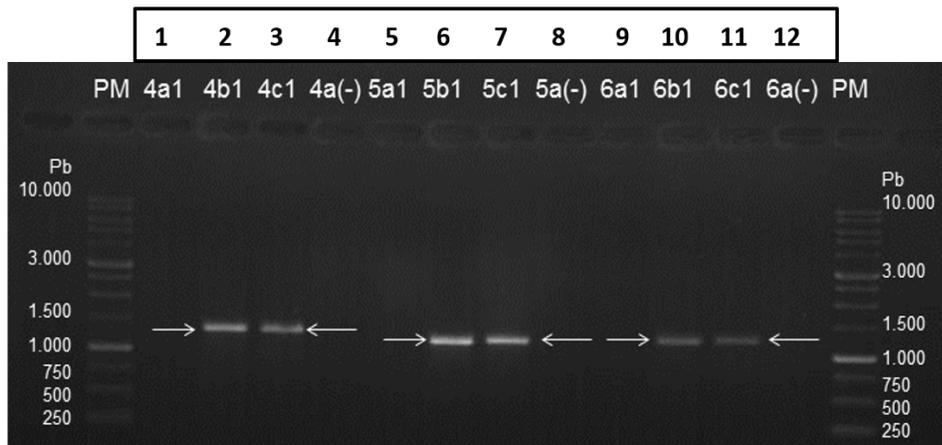


Figura 12. Especificidad y tamaño del amplicón de mezclas 4, 5 y 6 a una temperatura de 64°C. Carril 1, 5 y 9 sin DMSO; carril 2, 6 y 10 con DMSO al 3%, todas las bandas observadas entre los 1000-1500 pb; carril 3, 7 y 11 con DMSO al 8%, todas las bandas observadas entre los 1000-1500 pb. (-): control negativo.

Luego de obtener la amplificación del gen CEBP α en uno o dos tramos, de acuerdo a los partidores utilizados, en muestras de individuos sanos, se pasó a replicar lo obtenido, aplicándolo a muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda, considerando matrices de sangre total y de aspirado de médula ósea.

Para la extracción de ADN se utilizó el kit Promega Wizard®, siguiendo el protocolo indicado en el Anexo 12. También se aplicó la extracción de ADN a un individuo sano como control y también a una muestra de cultivo celular THP correspondiente a células blásticas de una leucemia Monoblástica aguda con el fin de emular un *in vitro* a un paciente leucémico.

Luego de obtener el ADN de cada una de las muestras, se cuantificó su concentración utilizando el equipo Qubit. Posteriormente, se realizó una electroforesis para determinar la integridad de las muestras procesadas.

De las muestras analizadas, se obtiene que todas aquellas que no fueron inmediatamente procesadas (> 24 horas desde la recolección), presentaban degradación del ADN.

A pesar de la baja celularidad de las muestras de pacientes con enfermedad mínima residual, se obtiene suficiente ADN para ser utilizado en la amplificación del gen CEBP α (Tabla 9)

Tabla 9. Muestras de pacientes con leucemia mieloblástica aguda (LAM), cultivo (THP) y control normal (N).

		Alícuotas	Tipo de Matriz	Debut o EMR	ADN (ng/uL) (Primera extracción)	Obs 1	ADN (ng/uL) (Segunda extracción)	Obs 2	Tiempo entre toma de muestra y procesamiento	Número de muestra
1	LAM	1	MO	Debut	16	Degradado	16	Degradado	2 días	-
2	LAM	2	MO	EMR	0.31	Insuficiente	20	OK	Antes de 24 horas	1
3	LAM	3	SP	Debut	16	Degradado	46	Degradado	3 días	-
4	LAM	3	SP	Debut	18	Ok			Antes de 24 horas	2
5	LAM	4	SP	Debut	17	Ok			Antes de 24 horas	3
6	LAM	1	SP	Debut	0.92	Insuficiente	-	-	Muestra consumida	-
7	LAM	1	SP	Debut	19	Degradado	-	.	2 días	-
8	LAM	1	SP	Debut	22	Ok			Antes de 24 horas	4
9	LAM	1	MO	Debut	40	Ok			Antes de 24 horas	5
10	LAM	3	MO	EMR	7	Ok			Antes de 24 horas	6
11	THP	0	Cultivo		17	Degradado	-	-	2 días	-
12	Normal	0			21	OK			Antes de 24 horas	7

Se realiza PCR gradiente a la muestra identificada con el N°4 utilizando como referencia, la ecuación de Wallace, la cual establece que:

$$T_m = (4^{\circ}\text{C} \times (\text{Número de G+C})) + (2^{\circ}\text{C} \times (\text{Número de A+T}))$$

Al aplicar la fórmula se obtienen una T_m de 63°C para el partidor PP1 y una T_m de 64°C para el partidor PP2.

Las temperaturas escogidas son 60, 61, 63, 64 y 65°C , donde además de utilizar ADN de paciente con LAM en duplicado para cada temperatura, se realiza un control negativo también en duplicado (Tabla 10, Figura 13).

Tabla 10. PCR gradiente utilizando ADN de paciente leucémico

Temperatura de alineamiento	Positivo (muestra ADN)		Negativo (Agua)		N°4 PP1F PP1R	Tamaño del amplicón 579 pb
60°C	10A	10B	10C	10D		
61°C	11A	11B	11C	11D		
63°C	13A	13B	13C	13D		
64°C	14A	14B	14C	14D		
65°C	15A	15B	15C	15D		
60°C	20A	20B	20C	20D	N°4 PP2F PP2R	Tamaño del amplicón 703 pb
61°C	21A	21B	21C	21D		
63°C	23A	23B	23C	23D		
64°C	24A	24B	24C	24D		
65°C	25A	25B	25C	25D		

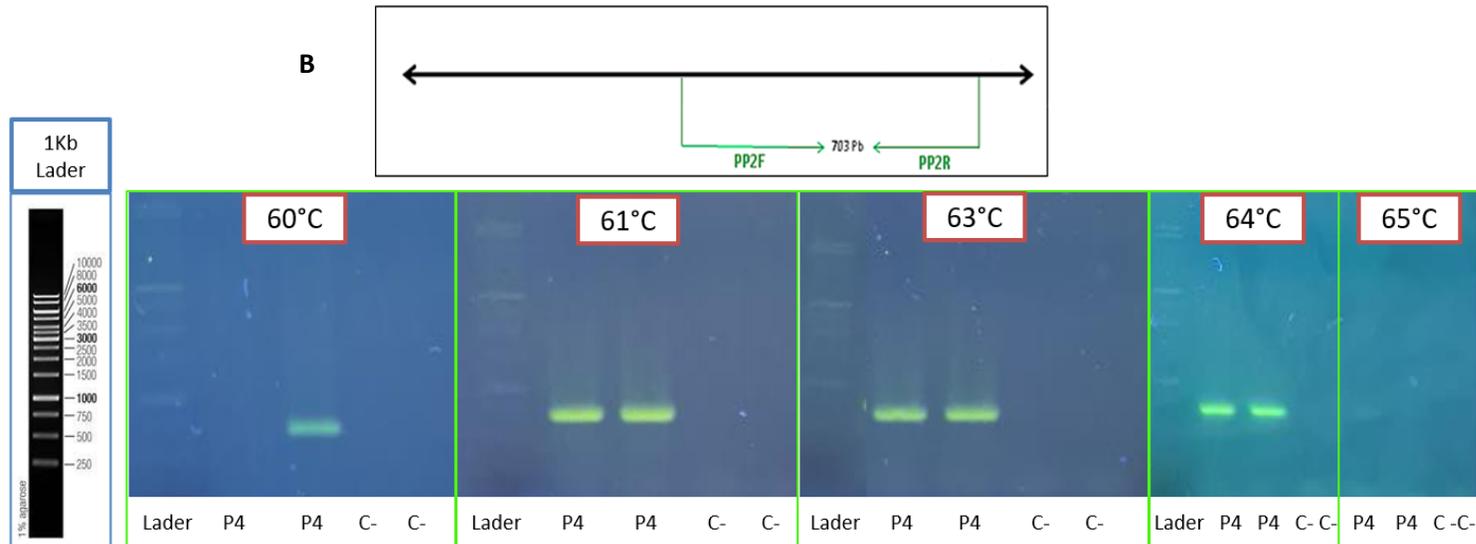
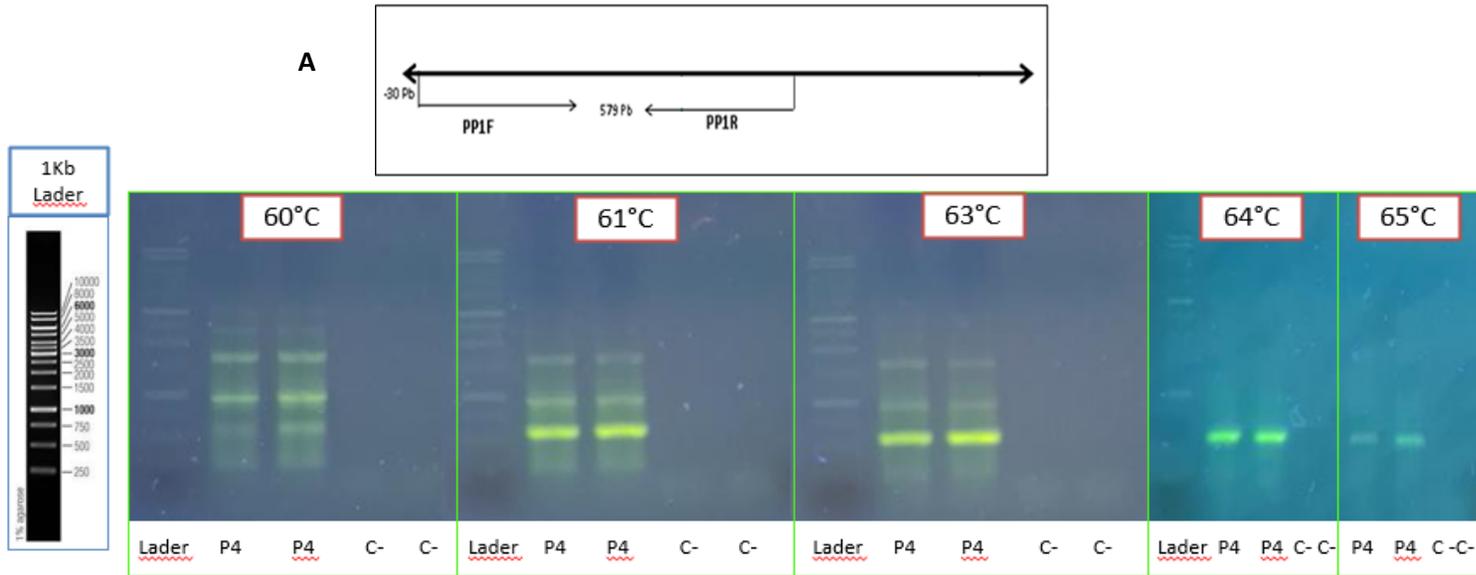


Figura 13. PCR gradiente para amplificación del gen CEBP α de paciente con LAM.

En la imagen **A** se muestra el resultado de la electroforesis para la amplificación del primer tramo del gen CEBPA (579pb) utilizando distintas temperaturas y DMSO al 3% junto al control negativo. En la imagen **B** se muestra el resultado de la electroforesis para la amplificación segundo tramo del gen CEBPA (703pb) utilizando distintas temperaturas y DMSO al 3% junto al control negativo

Tabla 11. Protocolo de mezcla para la amplificación del gen CEBP α de paciente N°4 con leucemia

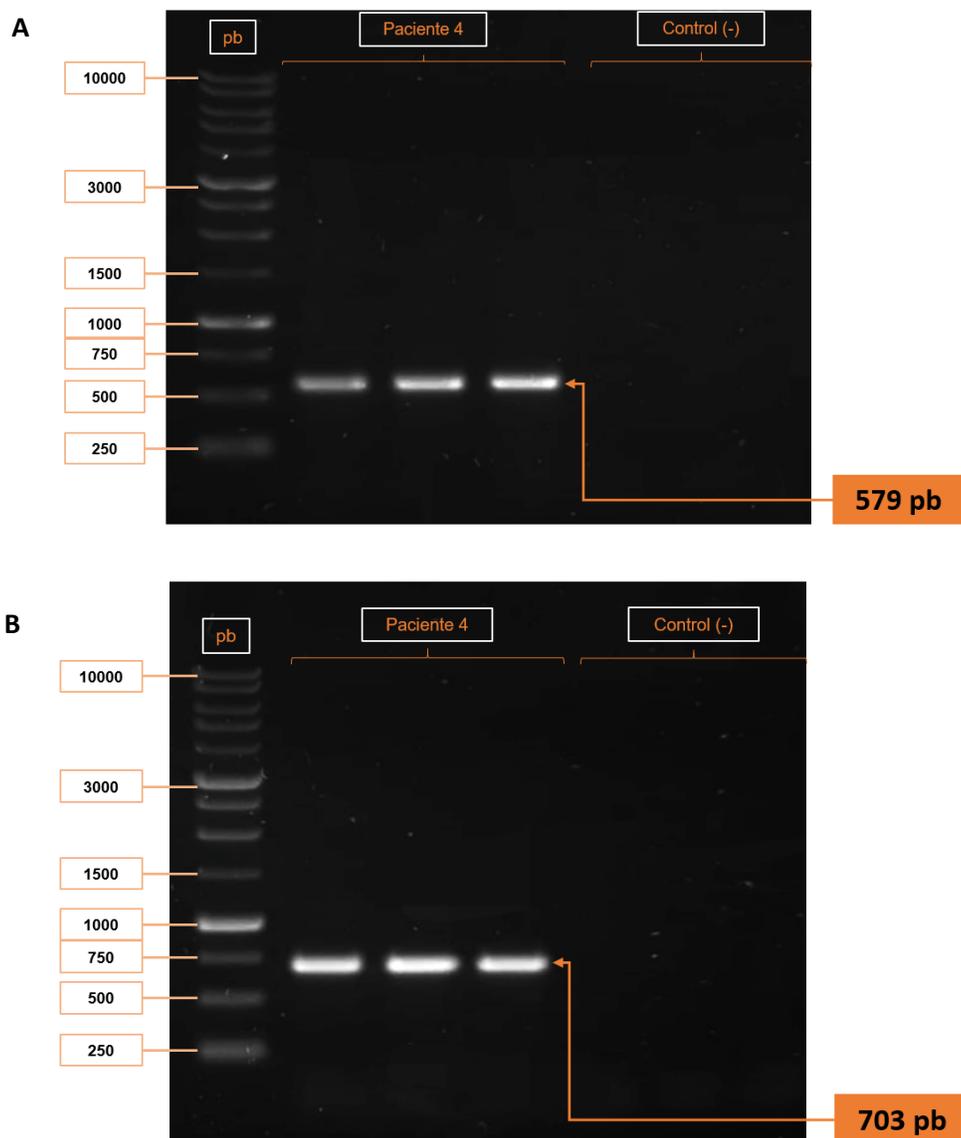
Paciente N°4									
	Tubo	1	2	3	4	5	6	7 (1x extra)	TOTAL
PP1	Taq	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	87,5
	F	1	1	1	1	1	1	1	7
	R	1	1	1	1	1	1	1	7
	DMSO	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	5,25
	Agua	5,15	5,15	5,15	5,15	5,15	5,15	4,75	35,65
	Muestra	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	5	
	Alicuotar MM	20	20	20	20	20	20		142,4
	Volumen total (100ng)	25	25	25	25	25	25		
Paciente N°4									
	Tubo	1	2	3	4	5	6	7 (1x extra)	TOTAL
PP2	Taq	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	87,5
	F	1	1	1	1	1	1	1	7
	R	1	1	1	1	1	1	1	7
	DMSO	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	5,25
	Agua	5,15	5,15	5,15	5,15	5,15	5,15	4,75	35,65
	Muestra	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6	5	
	Alicuotar MM	20	20	20	20	20	20		142,4
	Volumen total (100ng)	25	25	25	25	25	25		

Tabla 12. Protocolo de mezcla para la amplificación del gen CEBP α de paciente N°6 con leucemia

Paciente N°6									
PP1	Tubo	1	2	3	4	5	6	7 (1x extra)	TOTAL
	Taq	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	87,5
	F	1	1	1	1	1	1	1	7
	R	1	1	1	1	1	1	1	7
	DMSO	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	5,25
	Agua	7,25	7,25	7,25	7,25	7,25	7,25	4,75	48,25
	Muestra	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	5	
	Alicuotar MM	22	22	22	22	22	22		155
	Volumen total (100ng)	25	25	25	25	25	25		
Paciente N°6									
PP2	Tubo	1	2	3	4	5	6	7 (1x extra)	TOTAL
	Taq	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	87,5
	F	1	1	1	1	1	1	1	7
	R	1	1	1	1	1	1	1	7
	DMSO	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	5,25
	Agua	7,25	7,25	7,25	7,25	7,25	7,25	4,75	48,25
	Muestra	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	5	
	Alicuotar MM	22	22	22	22	22	22		155
	Volumen total (100ng)	25	25	25	25	25	25		

Una vez obtenida la temperatura de alineamiento adecuada para la amplificación del gen CEBP α en dos tramos, se realizó una PCR convencional a los pacientes con el número 2, 3, 4, 5 y 6. Los pacientes 4 y 6 se ejemplifican en la figura 10. Los pacientes con número 1 y 7 no pudieron ser procesados desde este paso en adelante debido al agotamiento de la muestra de ADN. (Tabla 9, Figura 14).

Para realizar la PCR convencional, se aplica el protocolo detallado en la tabla 11 y 12.



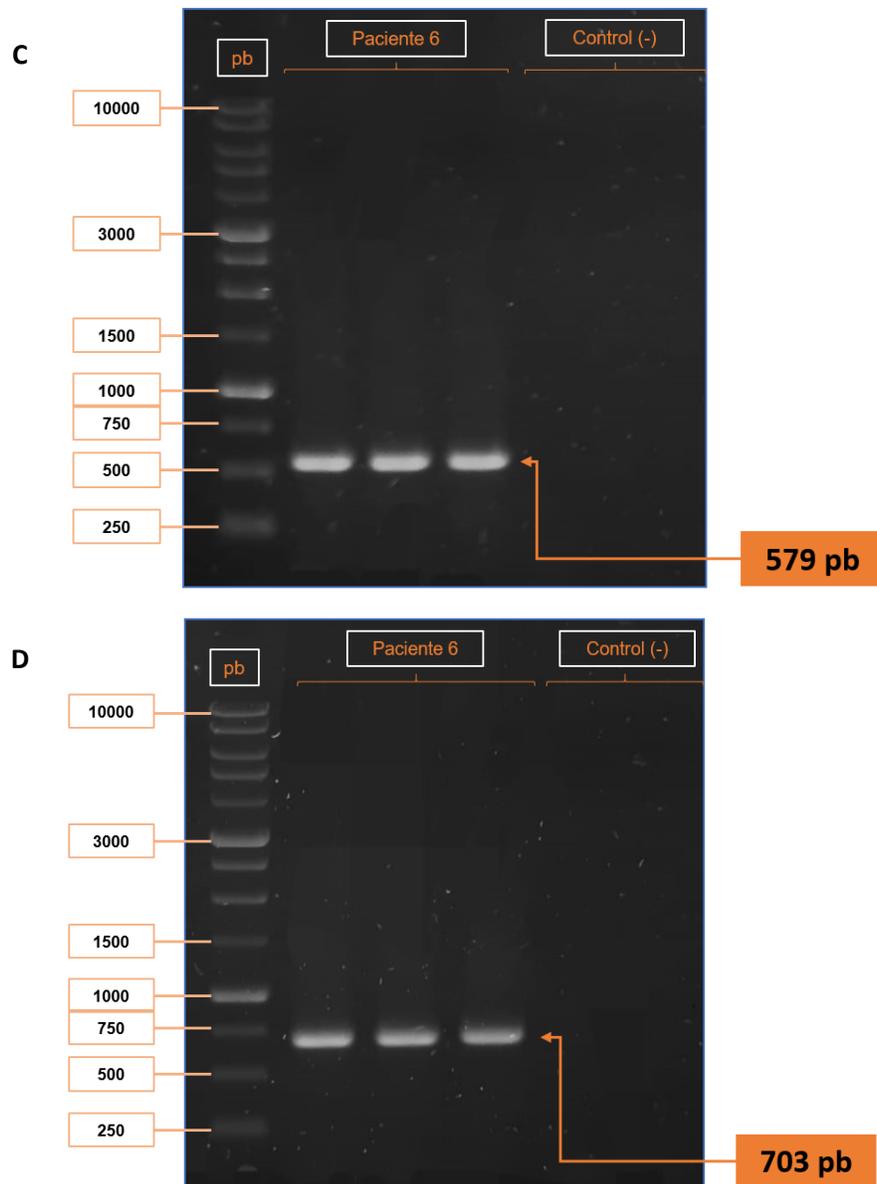


Figura 14. Amplificación en 2 tramos del gen CEBP α de pacientes con LAM.

En la imagen **A** se observa una electroforesis de ADN correspondiente al tramo corto de 579pb del gen CEBPA amplificado la muestra N°4. La imagen **B** muestra una electroforesis de ADN correspondiente al tramo largo de 703pb del gen CEBPA amplificado de la muestra N°4. En la imagen **C** se observa una electroforesis de ADN correspondiente al tramo corto de 579pb del gen CEBPA amplificado la muestra N°6. La imagen **D** muestra una electroforesis de ADN correspondiente al tramo largo de 703pb del gen CEBPA amplificado de la muestra N°6.

Luego de comprobar a través de la electroforesis, que el protocolo de PCR desarrollado para la amplificación del gen CEBP α en dos tramos (partidores PP1 y PP2), utilizando DMSO al 3%, realizando un triplicado para la corrida del material genético y un triplicado para el control negativo, se realiza nuevamente una PCR convencional para las muestras 2, 3, 4, 5 y 6. Los amplicones obtenidos de cada muestra y de cada tramo en triplicado, se juntan en tubos de 1.5mL alcanzando la concentración de 45 ng/uL, cumpliendo con el rango de concentración requerido para purificar y secuenciar cada amplicón.

Tabla 13. Amplificación del gen CEBP α de muestras con leucemia para envío a secuenciación.

		Muestra ADN			Agua			
Muestra de ADN insuficiente, no se realiza el PCR	MUESTRA 1	PP1	1A1	1A1	1A1	1A2	1A2	1A2
		PP2	1B1	1B1	1B1	1B2	1B2	1B2
	MUESTRA 2	PP1	2A1	2A1	2A1	2A2	2A2	2A2
		PP2	2B1	2B1	2B1	2B2	2B2	2B2
	MUESTRA 3	PP1	3A1	3A1	3A1	3A2	3A2	3A2
		PP2	3B1	3B1	3B1	3B2	3B2	3B2
	MUESTRA 4	PP1	4A1	4A1	4A1	4A2	4A2	4A2
		PP2	4B1	4B1	4B1	4B2	4B2	4B2
	MUESTRA 5	PP1	5A1	5A1	5A1	5A2	5A2	5A2
		PP2	5B1	5B1	5B1	5B2	5B2	5B2
	MUESTRA 6	PP1	6A1	6A1	6A1	6A2	6A2	6A2
		PP2	6B1	6B1	6B1	6B2	6B2	6B2
Muestra de ADN insuficiente, no se realiza el PCR	MUESTRA 7	PP1	7A1	7A1	7A1	7A2	7A2	7A2
		PP2	7B1	7B1	7B1	7B2	7B2	7B2

8.3 ANÁLISIS DE LA SECUENCIACIÓN DEL GEN CEBP α EN 2 TRAMOS DE PACIENTES CON LAM.

Luego de recibir los resultados de secuenciación sanger del departamento de especialidad de la Pontificia Universidad Católica de Chile, se realizó el análisis de las secuencias, realizando alineamientos con la región codificante del gen CEBP α wt, publicada en la “National Library of Medicine” (NLM) (figura 15).

Para realizar el análisis de las secuencias obtenidas a través de la secuenciación sanger, se utilizó el programa BioEdit, con el que se pudo visualizar los electroferogramas de cada una de las muestras y tramos amplificados (Figura 16).

Una vez obtenidas las secuencias del tramo largo del gen CEBP α de los 5 pacientes con LAM analizados, utilizando el partidor PP2F, se realiza el alineamiento de la región bZIP con la secuencia obtenida. Los resultados se observan en la figura 17 y 18, muestran que todas secuencias analizadas de la amplificación del tramo largo del gen CEBP α utilizando el partidor PP2F, alinearon con la secuencia completa wt de la región bZIP.

A partir de este trabajo, fue posible generar un protocolo para secuenciación del gen CEBP α a partir de sangre periférica o médula osea que pueda ser utilizado para el diagnóstico de paciente con LMA (ve anexo 12).

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide Nucleotide Search

Advanced Help

FASTA

Showing 1.08kb region from base 5111 to 6187.

Homo sapiens CCAAT enhancer binding protein alpha (CEBPA), RefSeqGene (LRG_456) on chromosome 19

NCBI Reference Sequence: NG_012022.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

>NG_012022.1:5111-6187 Homo sapiens CCAAT enhancer binding protein alpha (CEBPA), RefSeqGene (LRG_456) on chromosome 19
 ATGGAGTCGGCCGACTTCTACGAGCGGAGCGCGGCCCCCGATGAGCAGCCACCTGCAGAGCCCGCCG
 ACGGCGCCAGCAGCGCCGCTTGGCTTTCCCGGGGCGCGGGCCCGCGCAGCCTCCCGCCACCTGC
 CGCCCGGAGCGCTGGGCGGATCTGGGAGCAGAGAGCTCATCGACATCAGCGCTACATCGACCG
 GCGGCTTCAACGACGAGTTCTGGCCGACCTGTTCAAGCACAGCCGGCAGCAGGAGAAGGCAAGGCGG
 CCGTGGGCCACCGGGCGCGCGCGCGGCGACTTTGACTACCGGGCGGCCCGCGGCGCCCGGGCG
 CGCCGTCATCCCGGGGAGCGCACGGGCCCGCCCGGCTACGGCTGCGCGGCGCGCGGCTACCTGGAC
 GCGAGGCTGGAGCCCTGTACGAGCGCTGGGGCGCGGGCGCTGGCGCGCTGGTGATCAAGGAGGAGC
 CCGCGAGAGGATGAAGCAAGCAGCTGGCGCTGGCGGCTCTTCTTCAACAGCGCGCGCGCGCCGCG
 GCGGCTTGGACCGCGACCGCACCGCGCGCCCGCGACCTGGCGCGCGCGCACCTGCAAGTTCAAGATC
 GCGCACGGCGCAGACCACTGACACTGCAAGCCCGTCAACCCACGCGCGCGCCCGCCCGCGCGGCGCC
 GCGCGCACCCCGCGCGCCCGCTGGTGCAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 CG
 CG
 AACAGCAACGAGTACCGGGTGCAGCGCGAGCGCAACATCAGCGGTGCGCAAGAGCGCGGACAGGCGCA
 AGCAGCGCAACGTGGAGACAGCAAGAAAGTGTGGAGCTGACAGTGACAATGACCGCTGCGCAAGCG
 GGTGGAAACAGCTGAGCGCGAAGTGGACAGCGCTGGGGGACATTCGCGCAGCTGCCAGAGAGCTCCTTG
 GTCAGGGCCATGGGCACTGCGCGTGA

Change region shown

Whole sequence
 Selected region
 from: 5111 to: 6187
 Update View

Customize view

Display options

Show reverse complement
 Show gap features
 Update View

Estadísticas:

Páginas	1
Palabras	16
Caracteres (sin espacios)	1.077
Caracteres (con espacios)	1.077
Párrafos	16
Líneas	16

Figura 15. Secuencia codificante del gen CEBPα. La secuencia codificante del gen CEBPA presenta una extensión de 1077pb cuyo detalle se encuentra publicado en la NLM a través del nombre Homo sapiens CCAAT enhancer binding protein Alpha (CEBPA) refseqgene (LRG_456) on chromosoma 19.

A

CCCCATGCCG	GCCGCGCGCT	AGGACCCAGC	AGGCGCCGCG	CCGCCGCAGC	CCGGGGACAG
AGGCCGCCTC	GGACTCTAGG	GGGCGACGCG	GCCTGCCGGG	TATAAAAGCT	GGGCCGGCGC
GGGCCGGGCC	ATTTCGCGACC	CGGAGGTGCG	CGGGCGCGGG	CGAGCAGGGT	CTCCGGGTGG
GCGGCGGCGA	CGCCCCGCGC	AGGCTGGAGG	CCGCCGAGGC	TCGCCATGCC	GGGAGAACTC
TAACTCCCC	ATGGAGTCGG	CCGACTTCTA	CGAGGCGGAG	CCGCGGCCCC	CGATGAGCAG
CCACCTGCAG	AGCCCCCGC	ACGCGCCAG	CAGCGCCGCC	TTTCGGCTTTC	CCCGGGGCGC
GGGCCCGCG	CAGCCTCCCG	CCCCACCTGC	CGCCCCGGAG	CCGCTGGGCG	GCATCTGCGA
GCACGAGACG	TCCATCGACA	TCAGCGCCTA	CATCGACCCG	GCCGCCTTCA	ACGACGAGTT
CCTGGCCGAC	CTGTTCAGC	ACAGCCGGCA	GCAGGAGAAG	GCCAAGGCGG	CCGTGGGCCC
CACGGGCGCG	GGCGGCGGCG	GCGACTTTGA	CTACCCGGGC	GCGCCGCGG	GCCCCGGCGG
CGCCGTATG	CCCGGGGAG	CGCACGGGCC	CCCGCCCGGC	TACGGCTGCG	CGGCCGCCGG
CTACCTGGAC	GGCAGGCTGG	AGCCCCGTGA	CGAGCGCGTC	GGGGCGCCGG	CGCTGCGGCC
GCTGGTGATC	AAGCAGGAGC	CCCGCGAGGA	GGATGAAGCC	AAGCAGCTGG	CGCTGGCCGG
CCTCTTCCCT	TACCAGCCGC	CGCCGCGGCC	GCCGCCCTCG	CACCCGCACC	CGCACCCGCC
GCCCGCGCAC	CTGGCCGCCC	CGCACCTGCA	GTTCCAGATC	GCGCACTGCG	GCCAGACCAC
CATGCACCTG	CAGCCCGGTC	ACCCACGCC	GCCGCCCAG	CCCGTGCCCA	GCCCCGACCC
CGCGCCCGCG	CTCGGTGCCG	CCGGCTGCC	GGGCCCTGGC	AGCGCGCTCA	AGGGGCTGGG
CGCCGCGCAC	CCCGACCTCC	GCGCGAGTGG	CGGCAGCGGC	GCGGGCAAGG	CCAAGAAGTC
GGTGACAAG	AACAGCAACG	AGTACCGGGT	GCGGCGCGAG	CGCAACAACA	TCGCGGTGCG
CAAGAGCCCG	GACAAGGCCA	AGCAGCGCAA	CGTGGAGACG	CAGCAGAAGG	TGCTGGAGCT
GACCAGTGAC	AATGACCGCC	TGCGCAAGCG	GGTGGAACAG	CTGAGCCGCG	AACTGGACAC
GCTGCGGGGG	ATCTTCCGCC	AGCTGCCAGA	GAGCTCCTTG	GTCAAGGCCA	TGGGCAACTG
CGCGTGAAGC	GCGCGGCTGT	GGGACCGCCC	TGGGCCAGCC	TCCGGCGGGG	ACCCAGGGAG
TGGTTTGGGG	TCGCCGATC	TCGAGGCTTG	CCCGAGCCGT	GCGAGCCAGG	ACTAGGAGAT
TCCGGTGCCT	CCTGAAAGCC	TGGCCTGCTC	CGCGTGTCCC	CTCCCTTCCT	CTGCGCCGGA
CTTGGTGCCT	CTAAGATGAG	GGGCCAGGC	GGTGGCTTCT	CCCTGCGAGG	AGGGGAGAAT
TCTTGGGGCT	GAGCTGGGAG	CCCGGCAACT	CTAGTATTTA	GGATAACCTT	GTGCCTTGGA
AATGCAAACCT	CACCGCTCCA	ATGCCACTG	AGTAGGGGGA	GCAAATCGTG	CCTTGTCAAT
TTATTTGGAG	GTTTTCTGCC	TCCTTCCCGA	GGCTACAGCA	GACCCCATG	AGAGAAGGAG
GGGAGCAGGC	CCGTGGCAGG	AGGAGGGCTC	AGGGAGCTGA	GATCCCGACA	AGCCCGCCAG
CCCCAGCCGC	TCCTCCACGC	CTGTCCCTAG	AAAGGGGTGG	AAACATAGGG	ACTTGGGGCT
TGGAACCTAA	GGTTGTTCCT	CTAGTTCTAC	ATGAAGGTGG	AGGGTCTCTA	GTTCCACGCC
TCTCCACCT	CCCTCCGCAC	ACACCCACC	CCAGCCTGCT	ATAGGCTGGG	CTTCCCCTTG
GGGCGGAACCT	CACTGCGATG	GGGGTCACCA	GGTGACCAGT	GGGAGCCCC	ACCCCGAGTC
ACACCAGAAA	GCTAGGTGCT	GGGTCAGCTC	TGAGGATGTA	TACCCCTGGT	GGGAGAGGGA
GACCTAGAGA	TCTGGCTGTG	GGGCGGGCAT	GGGGGTGAA	GGGCCACTGG	GACCCCTCAGC
CTTGTTTGTA	CTGTATGCCT	TCAGCATTGC	CTAGGAACAC	GAAGCACGAT	CAGTCCATCC
CAGAGGGACC	GGAGTTATGA	CAAGCTTTCC	AAATATTTTG	CTTTATCAGC	CGATATCAAC
ACTTGTATCT	GGCCTCTGTG	CCCCAGCAGT	GCCTTGTGCA	ATGTGAATGT	GCGGCTCTCT
GCTAAACCAC	CATTTTATTT	GGTTTTTGT	TTGTTTTGGT	TTTGCTCGGA	TACTTGCCAA
AATGAGACTC	TCCGTCCGCA	GCTGGGGGAA	GGGTCTGAGA	CTCCCTTTC	TTTTGGTTTT
GGGATTACTT	TTGATCCTGG	GGGACCAATG	AGGTGAGGGG	GGTCTCCTT	TGCCCTCAGC
TTTCCCAGC	CCCTCCGGCC	TGGGTGCC	ACAAGGCTTG	TCCCCAGAG	GCCCTGGCTC
CTGGCTGGGA	AGGGAGGTGG	CCTCCCAGCA	ACGCATCACT	GGGGCTGGGA	GCAAGGAGG
ACGGCTTGGT	TCTCTTCTTT	TGGGGAGAAC	GTAGAGTCTC	ACTCTAGATG	TTTTATGTAT
TATATCTATA	ATATAAACAT	ATCAAAGTCA	ATGTCGGTGT	CTTTTTAAAA	CCAGAAAGAA
GCTACTTCCA	AGGTTGTCTG	TGGGCCAGGT	CACATTTGTA	AATAATACAG	CATTTTCCCT
GGCGGCAATC	CTGACTTTCA	TGAGCTCTCC	ATCCATCCTG	AGCCCTCTT	ACCCTAAGGG

B

```
PP1F: TCGCCATGCCGGGAGAACTC
PP1R: CTGGCCGGCCTCTTCCCTTACCAG
Rc   : CTGGCCGGCCTCTTCCCTTACCAG

PP2F: CCGCTGGTGATCAAGCAGGA
PP2R: CACGGTCTGGGCAAGCCTCGAGAT
Rc   : ATCTCGAGGCTTGCCAGACCGTG
```

```
TAD 1 210 a 291
CCCGGGGCGC GGGCCCCGCG CAGCCTCCG CCCACCTGC CGCCCCGAG CCGCTGGGCG GCATCTGCGA
GCACGAGACG T
```

```
TAD 2 381 a 600
CCGCCCCGC TACGGCTGCG CGGCCGCCG CTACCTGGAC GGCAGGCTGG AGCCCCTGTA CGAGCGCGTC
GGGGCGCCG CGCTGCGGCC GCTGGTGATC AAGCAGGAGC CCCGCGAGGA GGATGAAGCC AAGCAGCTGG
CGCTGGCCGG CCTTTCCT TACCAGCCGC CGCCGCGCC GCCGCCCTCG CACCCGCACC CGCACCCGCC
GCCGCGCAC
```

```
DBD 834 a 918
GACAAG AACAGCAACG AGTACCGGT GCGGCGCGAG CGCAACAACA TCGCGGTGCG
CAAGAGCCGC GACAAGGCCA AGCAGCGC
```

```
bZIP 951 a 1035
GACCAGTGAC AATGACCGCC TGCACAAGCG GGTGGAACAG CTGAGCCGCG AACTGGACAC
GCTGCGGGGC ATCTTCGCC AGCT
```

C

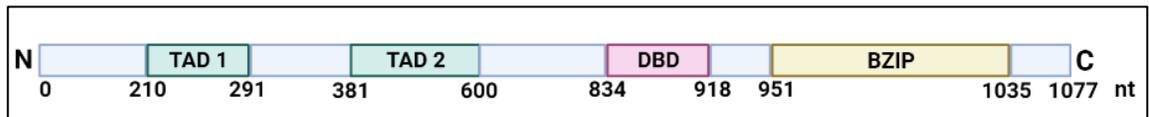
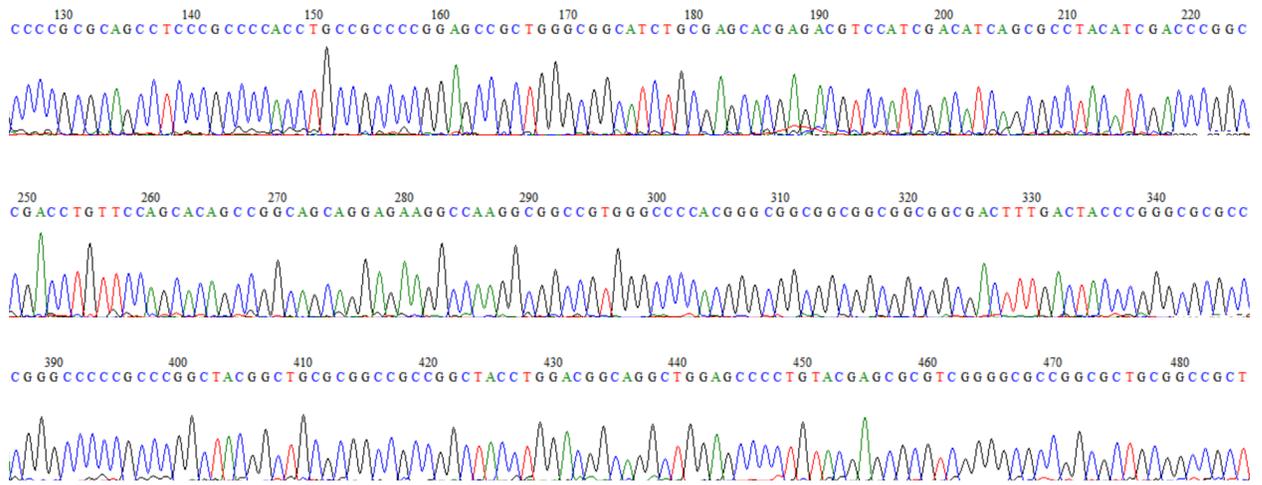


Figura 16. Secuencia completa del gen CEBPα marcada con partidores y regiones TAD 1, TAD2, DBD y bZIP. A. muestra la secuencia codificante del gen CEBPα marcada de color negro. **B.** se identifica la secuencia de las distintas regiones que componen el gen CEBPα. También se marcan los partidores PP1 y PP2 utilizados para amplificar en dos tramos al gen CEBPα con un solapamiento en la zona central. **C.** Esquema de las regiones del gen CEBPα marcando la posición exacta de cada una de ellas, TAD1 (210 – 291), TAD 2 (381 – 600), DBD (834 – 918) y BZIP (951 – 1035).

A



B

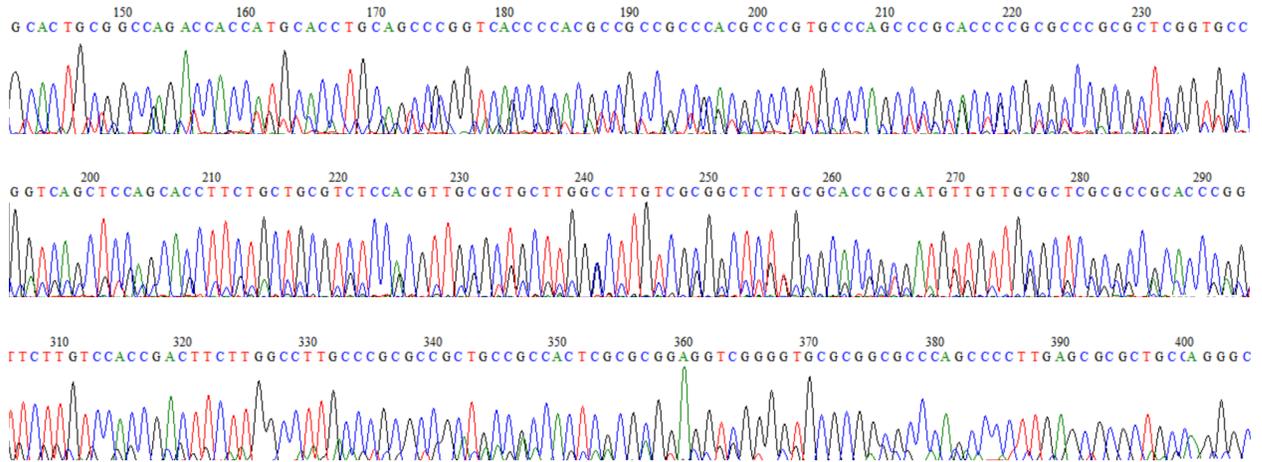


Figura 17. Electroferogramas obtenidos del tramo corto del gen CEBP α de un paciente con LAM analizado con BioEdit Sequence Alignment Editor. A Electroferograma del tramo corto del gen CEBP α utilizando el partidor PP1F. B Electroferograma del tramo corto del gen CEBP α utilizando el partidor PP1R.

A (2 PP2 F)

F	CGTCGCCGCCGCCGCCGCCCTCGCATCCGCACCCGCACCCGCCGCCGCCGCCGACCTGGCCG	60
bZIP	-----	0
F	CCCCGCACCTGCAGTTCAGATCGCGCACTGCGGCCAGACCACCATGCACTTGCAGCCCG	120
bZIP	-----	0
F	GTCACCCACGCCGCCGCCACGCCGTGCCAGCCCGCACCCGCCGCCGCCGCTCGGTG	180
bZIP	-----	0
F	CCGCCGGCCTGCCGGGCCCTGGCAGCGCGCTCAAGGGGCTGGGCGCCGCGCACCCCGACC	240
bZIP	-----	0
F	TCCGCGCGAGTGGCGGCAGCGGCGGGCAAGGCCAAGAAGTCGGTGGACAAGAACAGCA	300
bZIP	-----	0
F	ACGAGTACCGGGTGCGGCGCGAGCGCAACAACATCGCGGTGCGCAAGAGCCGCGACAAGG	360
bZIP	-----	0
F	CCAAGCAGCGCAACGTGGAGACGCAGCAGAAGGTGCTGGAGCTGACCAGTGACAATGACC	420
bZIP	-----GACCAGTGACAATGACC *****	17
F	GCCTGCGCAAGCGGGTGGAAACAGCTGAGCCGCGAACTGGACACGCTGCGGGGCATCTTCC	480
bZIP	GCCTGCGCAAGCGGGTGGAAACAGCTGAGCCGCGAACTGGACACGCTGCGGGGCATCTTCC *****	77
F	GCCAGCTGCCAGAGAGCTCCTTGGTCAAGGCCATGGGCAACTGCGCGTGAGGCGCGCGGC	540
bZIP	GCCAGCTG----- *****	85
F	TGTGGGACCG 550	
bZIP	----- 85	

B (3 PP2 F)

F	CGCCGCCGCCGCCCTCCATTGCCACCGGCATTGACCGCCGGCGTCTCTGGCCGCCCCGC	60
bZIP	-----	0
F	ACCTGATGCTTCCAGATCGTGTCTGTTCGCCAGACCACCTTGCCCTGCCTGGGTAC	120
bZIP	-----	0
F	CCCACATTGCCACTGACCCCTTGCCAGCTTCTGCTGCGTGTCCGCGTTCGGCGCCTTG	180
bZIP	-----	0
F	GGCTTGCCGGGCCTTGGGAGCACCTCATGGTGTGGGCTCCCCCACCCACCTCTCG	240
bZIP	-----	0
F	TTGAGTGGCTTGTCCACCGACTTCTTGCTTGCCCGCGTGGATAACAACACTCACGAGTA	300
bZIP	-----	0
F	CGTGGGGCTGCGCGAGCCCAACAACCTTGAGTGCCTGCAGCGGCCACGAGGGCCAGCAG	360
bZIP	-----	0
F	CACAAAGTGCAGACGCAGGGTAAGGTGCTGGAGCTGACCAGTGACAATGACCGCCTGCGC	420
bZIP	-----GACCAGTGACAATGACCGCCTGCGC *****	25
F	AAGCGGTGGAACAGCTGAGCCGCGAACTGGACACGCTGCGGGGCATCTTCGCCAGCTG	480
bZIP	AAGCGGTGGAACAGCTGAGCCGCGAACTGGACACGCTGCGGGGCATCTTCGCCAGCTG *****	85
F	CCGAGAGCTCCTTGGTCAAGGCCATGGGCAACTGCGCGTGAGGGCGCGGCTGTGGGA	540
bZIP	-----	85
F	CCGCCCTGGGCCAGCTCCGGCGGGGACCCAGGGAGTGGTTTGGGGTCGCCGATCTCGA	600
bZIP	-----	85
F	GGCT	604
bZIP	----	85

C (4 PP2 F)

F	GGCACCCGCCGCCGGCGCATCTGGCCGCCCCGCACCTGATGCTTCCAGATCGCGTACTGC	60
bZIP	-----	0
F	GGCCAGACCACCTTGCACCTGCAGCCCGGTACCCCCACGCCACCCACTCCCTTGCCC	120
bZIP	-----	0
F	AGCCTGCGCCGCGTGCCCGCGCTCGGTGCCTCGGGCCTGCCGGCCTTGGGCGCACGCTC	180
bZIP	-----	0
F	ATGGTGTTGGGCTCCCCGCACCCCGACCTCCGCGCGAGTGGCGGCAGCGGCGCGGTCTTG	240
bZIP	-----	0
F	CCAATGCCTCGGTGGACAACAACACTAACGAGTACGTGGTGCTGCGCGAGCGCAACAACA	300
bZIP	-----	0
F	TCTGAGTGCGCAAGAGCCGCGACGAGGGCAAGCAGCGCAACGTGCAGACGCAGCATAAGG	360
bZIP	-----	0
F	TGCTGGAGCTGACCAGTGACAATGACCGCCTGCGCAAGCGGTGGAACAGCTGAGCCGCG	420
bZIP	-----GACCAGTGACAATGACCGCCTGCGCAAGCGGTGGAACAGCTGAGCCGCG	50

F	AACTGGACACGCTGCGGGGCATCTTCCGCCAGCTGCCGGAGAGCTCCTTGGTCAAGGCCA	480
bZIP	AACTGGACACGCTGCGGGGCATCTTCCGCCAGCTG-----	85

F	TGGGCAACTGC 491	
bZIP	----- 85	

D (5 PP2 F)

F	CGCCGCCGCCCTCGCATCCGCACCGGCACCCGCCCGGGCGCACCTGGCCGCCCCGCACC	60
bZIP	-----	0
F	TGCAGTTCAGATCGCGCACTGCGGCCAGACCACCATGCACCTGCAGCCCGGTACCCCA	120
bZIP	-----	0
F	CGCCGCCGCCACGCCGTGCCAGCCCGCACCCCGCGCCCGCGCTCGGTGCCGCGGGCC	180
bZIP	-----	0
F	TGCCGGGCCCTGGGAGCGCGCTCAAGGGGCTGGGCGCCGCGCACCCCGACCTCCGCGCGA	240
bZIP	-----	0
F	GTGGCGGCAGCGGCGGGCAAGGCCAATAAGTCGGTGGACAACAACAGCAACGAGTACC	300
bZIP	-----	0
F	GGGTGCGGCGGAGCGCAACAACATCGCGGTGCGCAAGAGCCGCGACGAGGGCAAGCAGC	360
bZIP	-----	0
F	GCAACGTGGAGACGCAGCATAAGGTGCTGGAGCTGACCAGTGACAATGACCGCCTGCGCA	420
bZIP	-----GACCAGTGACAATGACCGCCTGCGCA *****	26
F	AGCGGGTGGAACAGCTGAGCCGCGAACTGGACACGCTGCGGGGCATCTTCCGCCAGCTGC	480
bZIP	AGCGGGTGGAACAGCTGAGCCGCGAACTGGACACGCTGCGGGGCATCTTCCGCCAGCTG- *****	85
F	CAGAGAGCTCCTTGGTCAAGGCCATGGGCAACTGCGCGTGAGGCGCGGGCTGTGGGACC	540
bZIP	-----	85
F	GCCCTGGGCCAGCCTCCGGCGGGGACCCAGGGAGTGTTTGGGGTCGCCGGATCTCGAGG	600
bZIP	-----	85
F	CTTGCCCAGACCGTG	615
bZIP	-----	85

E (6 PP2 F)

F	CGCCGCCGCCGCCCTCGCATCCGCACCCGCACCCGCCGCCCGCGCACCTGGCCGCC	60
bZIP	-----	0
F	CGCACCTGCACTTCCAGATCGCGCACTGCGGCCAGACCACCATGCACCTGCAGCCCGGTC	120
bZIP	-----	0
F	ACCCACGCCGCCGCCACGCCCGTGCCAGCCCGCACCCCGGCCGCCGCTCGGTGCCG	180
bZIP	-----	0
F	CCGGCCTGCCGGGCCCTGGGAGCGCGCTCAAGGGGCTGGGCGCCGCGCACCCCGACCTCC	240
bZIP	-----	0
F	GC CGGAGTGGCGGCAGCGGCGGGCAAGGCCAAGAAGTCGGTGGACAAGAACAGCAACG	300
bZIP	-----	0
F	AGTACCGGGTGGCGCGGAGCGCAACAACATCGCGGTGCGCAAGAGCCGCGACAAGGGCA	360
bZIP	-----	0
F	AGCAGCGCAACGTGGAGACGCAGCAGAAGGTGCTGGAGCTGACCAGTGACAATGACCGCC	420
bZIP	-----GACCAGTGACAATGACCGCC *****	20
F	TGCGCAAGCGGGTGGAAACAGCTGAGCCGCGAACTGGACACGCTGCGGGGCATCTCCGCC	480
bZIP	TGCGCAAGCGGGTGGAAACAGCTGAGCCGCGAACTGGACACGCTGCGGGGCATCTCCGCC *****	80
F	AGCTGCCAGAGAGCTCCTTGGTCAAGGCCATGGGCAACTGCGCGTGAGGCGCGCGGCTGT	540
bZIP	AGCTG----- ****	85
F	GGGACCGCCCTGGGCCAGCCTCCGGCGGGGACCCAGGGAGTGGTTTGGGGTCGCCGGATC	600
bZIP	-----	85
F	TCGAGGCTTGCCCAGACCGTG	621
bZIP	-----	85

Figura 18. Alineamiento entre las secuencias del tramo largo del gen CEBP α de los pacientes con LAM y la región bZIP wt

A Alineamiento de la secuencia forward del tramo largo del gen CEBP α de la muestra N°2, con la secuencia wt de la región bZIP. **B** Alineamiento de la secuencia forward del tramo largo del gen CEBP α de la muestra N°3, con la secuencia wt de la región bZIP. **C** Alineamiento de la secuencia forward del tramo largo del gen CEBP α de la muestra N°4, con la secuencia wt de la región bZIP. **D** Alineamiento de la secuencia forward del tramo largo del gen CEBP α de la muestra N°5, con la secuencia wt de la región bZIP. **E** Alineamiento de la secuencia forward del tramo largo del gen CEBP α de la muestra N°6, con la secuencia wt de la región bZIP.

9 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

Las muestras de sangre periférica y médula ósea se caracterizan por su gran amplitud de variación en el número de células en pacientes con LMA, los que debutan habitualmente con hiperleucocitosis pero, luego de un tratamiento, su recuento puede bajar a niveles críticos, por lo que el procesamiento de extracción de ADN podría verse limitado tanto por una baja cantidad de material genético en leucopenias graves o sobrepasando la estequiometría saturando el método de extracción en hipercelularidades (Moreno et al., 2013). El recuento celular para una médula ósea es difícil dado el gran tamaño de algunos elementos celulares, los que podrían obstruir el equipo, por lo que se decidió trabajar con muestras de sangre periférica de voluntarios sanos, muestra que también es solicitada en un paciente con LMA, para estandarizar un recuento celular determinado en base a una dilución de trabajo y posterior extracción de ADN (ver tabla 4).

La calidad del ADN es un punto clave en la aplicación de diversas técnicas moleculares (Ríos-Sánchez et al., 2016). Para su estudio, se analizaron los parámetros de pureza y concentración (ng/uL) (ver tablas 5, 6 y 7). La pureza fue considerada óptima entre los rangos 1.8 y 2.0, un valor superior se considera poco confiable por la existencia de proteínas y/o solventes orgánicos que intervendrían en el proceso de extracción (Green & Sambrook, 2012).

En este trabajo se realizó la extracción de ADN bajo los métodos de Sales y Columna con y sin perlas como método de lisis celular. El método de Columna con Perlas se eligió

para optimizar la liberación del material genético, sin embargo, no produjo un gran rendimiento con respecto a la concentración de ADN obtenido por Columna convencional ($p < 0,05$), puesto que, en una muestra hipercelular, el uso de perlas se ve sobrepasado y disminuye su rendimiento (Cadavid, Ramirez, López & Mambuscay, 2009). Por el bajo rendimiento de la técnica para llevar a cabo la PCR, que según Mas et al (2001) requiere una concentración mínima, en el caso de zonas repetidas de 10-50 ng/ μ L, esta técnica se descartó a pesar de tener una buena pureza (ver figuras 3 y 4).

El estudio de la repetitividad de las técnicas de Columna y Sales (ver figura 5), evidenció que el método de extracción de ADN por Sales desde Sangre Completa, a pesar de obtener menores concentraciones de ADN, es una técnica óptima para realizar una PCR debido a la alta pureza obtenida en cada muestra, reflejado en los menores valores de dispersión. Respecto a la reproducibilidad de muestras de Sangre Completa y Concentración de Leucocitos en la técnica de Sales (ver figura 4 y 5), es posible concluir que a partir de una muestra de Concentrado Leucocitario es viable obtener una mayor concentración de ADN, sin embargo, aspectos entre ambos tipos de muestras, de pureza y concentración de ADN no alteraron el rendimiento de la técnica ($p > 0,05$). La reproducibilidad de la técnica de Columna para estas mismas condiciones celulares (ver figura 5 y 6), también evidenció que la muestra más óptima es la de Concentrado Leucocitario, pero esta vez se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$) en cuanto a concentración de ADN. Teniendo en cuenta lo anterior, se comparó el rendimiento de la muestra de Concentración de Leucocitos entre las técnicas

de Sales y Columna (ver gráfico 7 y 8), para lo cual, considerando el análisis estadístico de los parámetros estudiados, tipo de muestra y posterior a la evaluación de la integridad del ADN (ver anexo 9), se indicó que la técnica de extracción por Sales fue la mejor para lograr una muestra de ADN con gran rendimiento y llevar a cabo una posterior PCR (ver anexo 2).

Una técnica de extracción ideal posee un número limitado de pasos, mínima utilización de disolventes peligrosos, uso limitado de equipos y es relativamente económica (Cadavid, Ramírez, López & Mambuscay, 2009). La técnica de extracción por Sales se ve favorecida gracias a su fácil implementación y bajo costo, sin embargo, presenta la desventaja de requerir un mayor tiempo para realizar la extracción, ser operador dependiente, necesitar una preparación correcta de reactivos antes de iniciar el proceso de extracción y el uso de reactivos tóxicos y cancerígenos como el cloroformo. La técnica de Sales es la técnica más óptima para trabajar en investigación, pero la técnica de Columna debe ser utilizada en el trabajo del laboratorio clínico por alto nivel de estandarización.

En cuanto a la amplificación del gen $CEBP\alpha$, el proceso inicial se realizó de acuerdo al protocolo recomendado para la PCR "GoTaq Green Master Mix", sin embargo, los resultados obtenidos fueron negativos. Los partidores usados en primer lugar como control positivo fueron los publicados por Shih et al (2005), sin un previo análisis informático para ahorrar tiempo y realizar la posterior estandarización. Primeramente, se

logró la amplificación de la porción inicial del gen, sin embargo, ésta fue inespecífica. La segunda porción, por su parte, no fue amplificada satisfactoriamente.

Debido a la complejidad del gen, se realizó un protocolo luego de estudiar a algunos autores que lograron la amplificación de CEBP α por fragmentos (Shih et al., 2005; Bedhad et al., 2005; Hegewisch, 2012). Se requirió variar el tiempo de desnaturalización inicial de 1 a 3 minutos para permitir la óptima separación del ADN, temperatura de alineamiento desde los 55°C a una variación entre 60 y 64°C, en relación a la Temperatura de Fusión (T_m) de los partidores, y el uso de DMSO a una concentración de 3% y 8% como adyuvante por su contribución a un aumento de la especificidad y separación de la doble hebra de ADN (Serrato, Flores, Cortez & Palacios, 2014) (ver tabla 8). Existen publicaciones que afirman que, en caso de querer realizar futuras secuenciaciones, sería necesario un mejor reactivo para lograr este objetivo, a pesar de ello, ambos reactivos poseen propiedades isoestabilizadoras que contribuyen al desarrollo de esta metodología (Jensen, Fukushima & Davis, 2010). Esto último fue demostrado en los resultados positivos obtenidos para la PCR, logrando amplificar el gen CEBP α , tanto por fragmentos como la región codificante completa, con resultados específicos a temperaturas de 62 y 64°C, donde fue posible visualizar una banda única representada en la electroforesis sólo con la ayuda de DMSO (ver figuras 3, 4, 5, 6, 7 y 8). Para la temperatura de 60°C los resultados fueron negativos o inespecíficos (ver figuras 3 y 6).

La importancia de haber logrado la amplificación completa de CEBP α con un solo par de partidores radica en presentar alternativas para su secuenciación (ver tabla 3), siendo más eficiente al detectar gran parte de las mutaciones, sin omitir casos que alberguen mutaciones de sustitución de bases (Ahn et al., 2009; Bedhad et al., 2015). La generar un factor pronóstico de sobrevida de los pacientes, de tal manera que cuando se presenta una sola mutación, se considera de mal pronóstico (sobrevida de 1,7 años con 1,5 años libre de recaída), mientras que doblemente mutado se considera de buen pronóstico (sobrevida 9,6 años con 9,4 años libre de recaída), la acción del factor de transcripción pierde funcionalidad, por lo tanto no va a favorecer ni la proliferación ni la diferenciación, frenando de alguna manera el proceso de leucemogénesis (Pastore et al., 2014; De Kouchkovsky, 2016).

Así también, cuando un paciente con Leucemia es tratado con quimioterapéuticos, posteriormente se estudia la EMR a partir de leucocitos provenientes de médula ósea o sangre periférica, para saber si se encuentran o no mutados para determinar el pronóstico y conocer si va a tener o no mayor resistencia a un nuevo tratamiento (Liang et al., 2015). En este sentido, la importancia de conocer el inmunofenotipo con CEBP α mutado permitiría lograr el diagnóstico, como se ha detectado en otras variantes de la LMA, corroborando la idea de que las mutaciones que tiene CEBP α arrojan un inmunofenotipo y perfil clínico característico (Walter et al., 2013).

La secuenciación del gen CEBPA a tomado cambios importantes en su interpretación en los últimos años.

Hoy en día se sabe que las mutaciones que afectan al gen pueden ser monoalélicas (sm) o bien, bialélicas (dm), considerando esta última como buen pronóstico, pero nuevos estudios publicados como el de Satoshi et al., 2022, evidencian que el factor de buen pronóstico de sobrevida y enfermedad libre de eventos, está dada por la presencia de mutaciones en la región bZIP (figura 19).

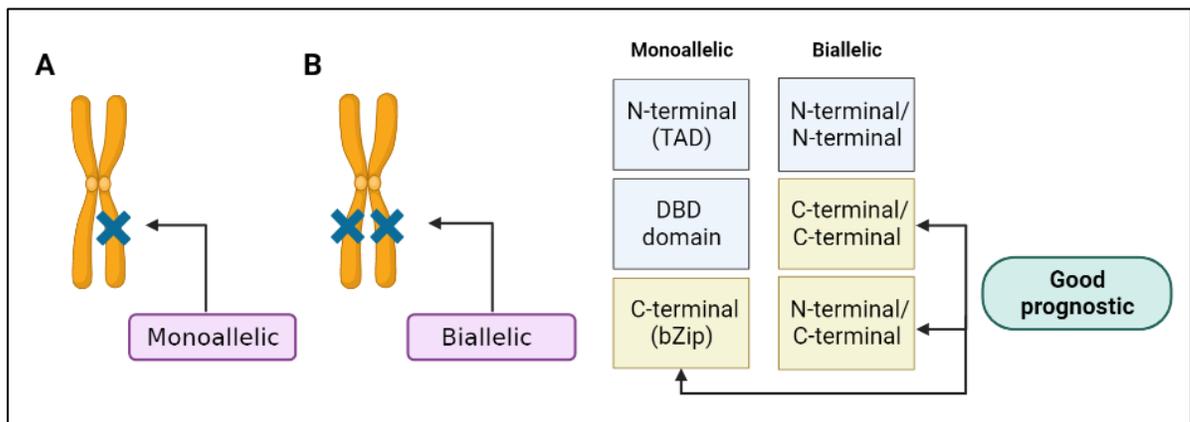


Figura 19. Ubicación de las mutaciones de acuerdo a la posición en el gen CEBPA.
A Esquema del cromosoma 19, con el gen $CEBP\alpha$ mutado de forma monoalélica. **B** Esquema del cromosoma 19, con el gen $CEBP\alpha$ mutado de forma bialélica. Se pueden dar 6 posibles resultados considerando mutaciones monoalélicas y bialélicas en combinación con los extremos N-terminal y C-terminal. La mayoría de las mutaciones del gen $CEBP\alpha$ ya sea de forma monoalélica o bialélica, se encuentran en la región bZIP, considerándose de buen pronóstico.

La secuenciación lograda en las 5 muestras analizadas de pacientes con LAM para la región bZIP, permiten construir un protocolo de análisis que entrega los lineamientos técnicos, de análisis e interpretación suficientes como para implementar la técnica en el ámbito clínico.

Los datos expuestos en esta revisión sugieren que la mutación CEBP α posee una buena supervivencia global y una buena supervivencia libre de eventos, dando principal relevancia en aquellas que estén dentro del marco bZip, en donde las últimas revisiones de la ELN (2022) nos indica que únicamente CEBP α mutado en el marco bZip es necesario para ser considerado como un estratificador importante en el abordaje terapéutico, pudiendo inclusive, utilizar altas dosis farmacológicas con intenciones curativas para aquellos pacientes con LMA (Döhner et al., 2022)

10 PROYECCIONES

Estudios realizados en población pediátrica, demostraron la asociación entre la presencia de mutaciones $CEBP\alpha$ con resultados clínicos favorables en pacientes con LMA, independientes de la presencia de mutaciones con FLT3/ITD (Liao X, et al., 2021). Esto abre una nueva posibilidad de seguir reinterpretando las mutaciones que se encuentran en el gen $CEBP\alpha$ específicamente en la región bZIP, ya que al parecer, puede ocasionalmente, ser un factor de mayor peso pronóstico de supervivencia global y enfermedad libre de eventos, en comparación con otras mutaciones, bajo el contexto etario, volviendo significativamente importante estudiar el gen $CEBP\alpha$ a nivel nacional en la población pediátrica, considerando además, que de acuerdo al último informe de vigilancia de cáncer infantil (RENCI, 2012 – 2016), muestran que la LAM es la segunda causa de neoplasia en 4 de los 6 subgrupos divididos por edad y sexo en esta población. Con el advenimiento de la secuenciación de segunda generación (Next Generation Sequencing NGS), numerosos estudios están siendo publicados últimamente en el ámbito de los pacientes con LAM. Por ejemplo, un estudio de Wang T et al., demostró que pacientes con LAM que presentaban mutaciones en WT1 y $CEBP\alpha$, tenían una supervivencia sin recaídas, supervivencia libre de eventos, y una supervivencia global, todas más bajas en comparación con un paciente con LAM $CEBP\alpha$ doble mutado, dando cuenta de la importancia de correlacionar y agrupar algunos genes mutados, con el perfilamiento clínico de algunos pacientes, para enfocar la terapia en cada uno de ellos (Wang T et al., 2022) .

REFERENCIAS

1. Agriello E., Cazap N., Dourisboure R., Fernández I., Ferrari L., Fischman L., Funes M., Giménez A., González J., Lang C., Mela M., Moirano M., Oliveira N., Rey I., Riccheri C. & Zanella L. Leucemias Agudas. Sociedad Argentina de Hematología. 2017; (1): 363 – 377.
2. Ahn, Jeung-yeal., Seo K., Weingberg O., Boyd S. D. & Arber D, A. A Comparison of Two Methods for Screening CEBPA Mutations in Patients with Acute Myeloid Leukemia.” The Journal of Molecular Diagnostics. 2009; 11(4): 319–23.
3. Akin D., Oner D., Kurekci E. & Akar N. Determination of CEBPA Mutations by Next Generation Sequencing in Pediatric Acute Leukemia. Bratislava Medical Journal. 2018; 119 (06): 366 –372.
4. Arber D., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M. & Le Beau M. The 2016 Revision of the World Health Organization's Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. Blood. 2016; 127 (20): 2391 – 2405.
5. Au C. H., Wa A., Ho D. N., Chan T. L., & Ma E. S. K. Clinical evaluation of panel testing by next-generation sequencing (NGS) for gene mutations in myeloid neoplasms. Diagnostic Pathology. 2016; 11, 11.
6. Avellino R. & Delwel R. Expression and regulation of C/EBP α in normal myelopoiesis and in malignant transformation. Blood. 2017; 129(15): 2083-2091.
7. Baena J., Ramos A., Gómez C. & Gómez D. Comparación de Métodos de Extracción de ADN en Tejidos Parafinados y Utilidad para Amplificación por PCR. Revista Colombiana de Biotecnología. 2013; 15 (1): 172-179.
8. Baccarani M. Moving Towards Patient-Centered Decision-Making in Chronic Myeloid Leukemia: Assessment of Quality of Life and Symptom Burden. Haematologic. 2014; 99 (2), 205 – 208.
9. Behdad A., Weigelin H., Kojo S., Johnson E. & Betz B. A Clinical Grade Sequencing-Based Assay for CEBPA Mutation Testing: Report of a Large Series of Myeloid Neoplasms. The Journal of Molecular Diagnostics. 2015; 17 (1): 76 – 84.
10. Bonetti P., Davoli T., Sironi C., Amati B., Pelicci P. G., & Colombo, E. Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 γ . The Journal of Cell Biology. 2008; 182 (1): 19–26.
11. Cadavid-Osorio E., Ramírez M., López W. A. & Mambuscay L. A. Estandarización de un Protocolo Sencillo Para la Extracción de ADN Genómico de Levaduras. Rev. Colomb. Biotecnol. 2009; 9 (1): 125 – 131.
12. Chen X. & Cherian S. Acute Myeloid Leukemia Immunophenotyping by Flow Cytometric Analysis. Clin Lab Med. 2017; 1 (1): 753 – 769.
13. De Kouchkovsky. Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Review and 2016 Update. Blood Cancer Journal. 2016; 6 (7): 1 – 10. Reinhardt D. & Zwaan C. Characterization of CEBPA Mutations and Promoter Hypermethylation in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. Haematologic. 2011; 96: 384 – 392.
14. Dufour A., Schneider F., Hoster, E., Benthaus T., Ksienzyk B., Schneider S., Spiekermann, K. Monoallelic CEBPA Mutations in Normal Karyotype Acute Myeloid

- Leukemia: Independent Favorable Prognostic Factor Within NPM1 Mutated Patients. *Annals of Hematology*. 2012; 91 (7): 1051-63.
15. Handschuh L., Wojciechowski P., Kazmierczak M., Marcinkowska-Swojak M., Luczak M., & Lewandowski K. NPM1 alternative transcripts are upregulated in acute myeloid and lymphoblastic leukemia and their expression level affects patient outcome. *Journal Of Translational Medicine*. 2008; 16 (1).
 16. Inglis P., Pappas M., Resende L. & Grattapaglia D. Fast and Inexpensive Protocols for Consistent Extraction of High-Quality DNA and RNA from Challenging Plant and Fungal Samples for High-Throughput SNP Genotyping and Sequencing Applications. 2018; 13(10):1-14.
 17. Jensen M. A., Fukushima M. & Davis R. W. DMSO and Betaine Greatly Improve Amplification of GC-Rich Constructs in De Novo Synthesis. *PLoS ONE*. 2010; 5(6): e11024.
 18. Konstandin N., Pastore F., Herold T., Dufour A., Rothenberg-Thurley M., Hinrichsen T., Ksienzyk B., Tschuri S., Schneider S., Hoster E., Berdel W., Woermann B., Sauerland M., Braess J., Bohlander S., Klein H., Hiddemann W., Metzeler K. & Spiekermann K. Genetic Heterogeneity of Cytogenetically Normal AML With Mutations of CEBPA. *The American Society of Hematology*. 2018. 20 (2): 2724 – 2731.
 19. Koschmieder S., Halmos B., Levantini E., & Tenen D. G. Dysregulation of the C/EBP α Differentiation Pathway in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009; 27(4): 619–628.
 20. Kotwal J., Manoj M. & Kapoor R. Detection of Balanced Translocations in Acute Lymphoblastic Leukemia by a Novel Multiplex Reverse Transcriptase Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. 2017; 13 (6): 1042 – 1046.
 21. Lagunas-Rangel F. Leucemia Mieloide Aguda. Una Perspectiva de los Mecanismos Moleculares del Cáncer. *Gaceta Mexicana De Oncología*. 2016; 15(3), 150 – 157.
 22. Leroy H., Roumier C., Huyghe P., Biggio V., Fenaux P. & Preudhomme C. CEBPA Point Mutations in Hematological Malignancies, *Leukemia*. 2005. 329 – 334.
 23. Liang-In L., Chien-Yuan C., Dong-Tsamn L., Jih-Luh T., You-Chia Y., Hwei-Ling S., Fang-Hsien S., Ming Y., Sheng-Yi H. & Hwei-Fang T. Characterization of CEBPA Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Most Patients with CEBPA Mutations Have Biallelic Mutations and Show a Distinct Immunophenotype of the Leukemic Cells. 2005; 11: 1372 – 1379.
 24. Lin T., Hou H., Chou W., Ou D., Yu D., Tien H. & Lin L. CEBPA Methylation as a Prognostic Biomarker in Patients with de Novo Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia*. 2011; 25 (1): 32 – 40.
 25. Matsuo H., Kajihara M., Tomizawa D., Watanabe T., Saito A., Fujimoto J., Horibe K., Kodama K., Tokumasu M., Itoh H., Nakayama H., Kinoshita A., Taga T., Tawa A., Taki S., Tanaka S. & Adachi S. Prognostic Implications of CEBPA Mutations in Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Report From the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Blood Cancer Journal*. 2015; 4(7): 226 – 228.
 26. Manelli F., Ponziani V., Bencini S., Bonetti M., Benelli M., Cutini I., Gianfaldoni G., Scappini B., Pancani F., Piccini M., Rondelli T., Caporale R., Grazia Gelli A., Peruzzi B., Chiarini M., Borlenghi E., Spinelli O., Giupponi D., Zanghi P., Bassan R., Rambaldi A., Rossi G. & Bosi. CEBPA–Double-Mutated Acute Myeloid Leukemia Displays a

- Unique Phenotypic Profile: A Reliable Screening Method and Insight Into Biological Features. *Haematologica*. 2017; 102 (3): 529 - 540.
27. Mas E., Poza J., Ciriza J., Zaragoza P., Osta R. & Rodellar C. Fundamento de La Reacción En Cadena de La Polimerasa (PCR).” *AquaTIC*. 2012; 15(10): 1–10.
 28. Meyer S. & Levine R. Translational Implications of Somatic Genomics in Acute Myeloid Leukaemia *Lancet Oncol*. 2014: 382 – 394.
 29. Mejía A., Muskus C., Torres J., Cuéllar F., Camargo M. & Vásquez G. Caracterización Molecular de las Mutaciones FLT3-ITD en Pacientes Colombianos con Leucemia Mieloide Aguda. *Rev Hematol Mex*. 2013; 14: 166 – 172.
 30. Fasan A., Haferlach C., Alpermann T., Jeromin S., Grossmann V., Eder C., Weissmann S., Dicker F., Kohlmann A., Schindela S., Kern W., Haferlach T. & Schnittger S. The Role of Different Genetic Subtypes of CEBPA Mutated AML. *Leukemia*. 2013; 28: 794 –803.
 31. Fuentes M., Rojas P. & Ernst D., Ocqueteau M., Bertin P., Sarmiento, M., & Ramírez, P. Resultados en el Tratamiento de Pacientes con Leucemia Mieloide Aguda no Promielocítica en el Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica entre los Años 2010-2014. *Revista Médica de Chile*. 2015; 143 (10): 1269 – 1276.
 32. Garibyan L. & Avashia N. Reacción en Cadena de la Polimerasa. *The Journal of investigative Dermatology*. 2013; 133 (3): 1-8
 33. Green M., & Sambrook J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual (4thed.)*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012.
 34. Hegewisch J. Detección de Mutaciones en el Gen CEBPA por Secuenciación en 42 Pacientes con Leucemia Aguda Mieloide. México. 2012
 35. Hickman M., Grisedale K., Bintz B., Burnside E., Hanson E., Ballantyne J. & Wilson M. Recovery of Whole Mitochondrial Genome from Compromised Samples Via Multiplex PCR and Massively Parallel Sequencing. *Future Sci. OA*. 2018; 4 (9): 2056 – 5623.
 36. Hollink H., Van den Heuvel-Eibrink M., Arentsen-Peters S., Zimmermann M., Peeters J., Valk P., Balgobind B., Sonneveld E., Kaspers G., De Bont E., Trka A., Creutzig U., Pieters R., Ministerio de Salud. *Guía Clínica: Leucemia en Personas Menores de 15 Años*. Santiago: Minsal. 2010.
 37. Li T., Gao J., Du M., Song J. & Mao, X. Milk Fat Globule Membrane Attenuates High-Fat Diet-Induced Obesity by Inhibiting Adipogenesis and Increasing Uncoupling Protein 1 Expression in White Adipose Tissue of Mice. *Nutrients*. 2018; 10 (3), 331.
 38. Lu J., Du C., Yao J., Wu B., Duan Y. & Zhou L. C/EBP α Suppresses Lung Adenocarcinoma Cell Invasion and Migration by Inhibiting β -Catenin. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017; 42(5): 1779-1788.
 39. Martínez del Pino L., Arana A., Alfonso L., Mendizábal J. A. & Soret B. Adiposity and adipogenic gene expression in four different muscles in beef cattle. *PLoS ONE*. 2017; 12(6).
 40. Molgaard-Hansen L., Möttönen M., Glosli H., Jónmundsson G., Abrahamsson J. & Hasle H. Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology (NOPHO). Treatment-Related Deaths in Second Complete Remission in Childhood Acute Myeloid Leukaemia. *Br J Haematol*. 2011; 152 – 159.
 41. Moreno M.J., Castilla C., Ortuño F. J., Gonzales M., Osma M. M, & Vicente V. Leucemia Aguda Con Eritrofagocitosis En Sangre Periférica Y Médula Ósea. *haematologica*. 2006; 91.

42. Neidler, S. What are the Differences Between PCR, RT-PCR, qPCR, and RT-qPCR. Science Center. 2017; 1.
43. Nichol J., Assouline S. & W, Miller. The Etiology of Acute Leukemia. Neoplastic Diseases of the Blood, Springer New York. 2013:177 – 198.
44. Osorio-Cadavid E., Ramírez M., López W. A. & Mambuscay L. A. Estandarización de Un Protocolo Sencillo Para La Extracción de ADN Genómico de Levaduras. Colomb, Biotecnol. 2009;11 (7): 125–31.
45. Pabst T. & Mueller B. Complexity of CEBPA Dysregulation in Human Acute Myeloid Leukemia. Clinical Cancer Research. 2009; 15 (17): 5303 – 5307.
46. Pastore F., Kling D., Hoster E., Dufour A., Konstandin N., Schneider S. & Spiekermann K. Long- Term Follow-up of Cytogenetically Normal CEBPA-Mutated AML. Journal of Hematology & Oncology. 2014; 1 (7): 55.
47. Peña J., Ramírez O. & Barrera E. Los Métodos Experimentales que Permiten el Estudio de las Macromoléculas de la Vida: Historia, Fundamentos y Perspectivas. Educ. quím vol. 2013; 24 (2): 237 – 246.
48. Perea G. Factores pronósticos en Leucemia Mieloide Aguda: Utilidad de los estudios inmunofenotípicos y moleculares. Departamento de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona. 2011; 113 – 116.
49. Pino D., Macías C., Lahera T., Marsán V., Sánchez M., Lázaro L., Del Valle O., Socarrás B. & Martínez M. Caracterización Inmunofenotípica de Pacientes con Leucemia Mieloide Aguda. Revista Cubana de Hematol, Inmunol y Hemoter. 2014; 30 (1): 27 – 35.
50. Puga B., Cabrera M., Undurraga M., Etcheverry R., Vacarezza R. & Ducach G. Acute Myeloid Leukemia in the Adult. Results of the National Antineoplastic Drug Protocol at the Hospital del Salvador, 1990-1998. Rev Med Chile. 2000; 128 (1): 1191 – 1198.
51. Puumala S. E., Ross J. A., Aplenc R. & Spector L. G. Epidemiology of Childhood Acute Myeloid Leukemia. Pediatr Blood Cancer. 2013; 60 (5): 728–733.
52. Reyes J. S., Brebi M P., Ili G. C., Muñoz N. S., Melo A. A., & Guerrero P. R. Perfil de Metilación de Genes Supresores de Tumores como Factor Pronóstico en Pacientes con Leucemia Mieloide Aguda. International Journal Of Morphology. 2011; 29(1): 151-157.
53. Ríos E., Calleros E., González A., Rubio J., Martínez O., Martínez A., Hernández S. & Pérez R. Comparative Analysis of Different DNA Extraction Methods and Their Genotyping Efficiency in Mexican Population. Acta Universitaria. 2016; 26 (4): 56 – 65.
54. Ríos-Sánchez, E., Calleros E., Zamora A., Rubio J., Martínez O. C., Martínez A., Hernandez S. & Morales R. Análisis Comparativo de Diferentes Métodos de Extracción de DNA y Su Eficiencia de Genotipificación En Población Mexicana. 2016; 6(4): 56–65.
55. Rose D., Haferlach T., Schnittger S., Perglerova´ K., Kern W. & Haferlach C. Subtype-specific patterns of molecular mutations in acute myeloid leukemia. Obesity, Fitness & Wellness Week. 2017.
56. Rubio P., Campos B., Digiorge J., Gallego M., Medina A. & Rossi J. NPM1, FLT3 and CEBPA Mutations in Pediatric Patients with AML from Argentina: Incidence and Prognostic Value. International Journal of Hematology. 2016; 104 (5): 582 – 590.

57. Rubnitz J., Gibson B., Smith F. Acute Myeloid Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010; 35 – 63.
58. Sánchez A. Texto Ilustrado e Interactivo de Biología Molecular e Ingeniería Genética (2ª ed). Madrid, España: Elsevier. 2012; 134 – 136, 201 – 208, 236, 418 – 420.
59. Sans-Sabrafen, J., Besses Raebel, C. y Vives Corrons, J. (2006). *Hematología Clínica*. 5th edición. Elsevier, pp.107-111, 409,410.
60. Serrato A., Flores Ll., Cortez J. & Palacios E. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Reserch Gate.* 2014; 1 – 23.
61. Sierra J. La Genética Como Guía del Manejo de la Leucemia Mieloide Aguda. *Hematología.* 2015; 19: 81 – 86.
62. Schnittger S., Schoch C., Kern W., Mecucci C., Tschulik C., Martelli M., Haferlach T., Hiddemann & Falini B. Nucleophosmin Gene Mutations are Predictors of Favourable Prognosis in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *Blood.* 2005; 106 (12): 3733 – 3739.
63. Shih L., Huang C., Lin T., Wu H., Wang P., Dunn P., Kuo M. & Tang T. Heterogeneous Patterns of CEBP a Mutation Status in the Progression of Myelodysplastic Syndrome and Chronic Myelomonocytic Leukemia to Acute Myelogenous Leukemia. *Clinical Cancer.* 2005; 11: 1821–1826.
64. Short N., Rytting P & Cortes P. (2018). Acute myeloid leukaemia. *Seminar.* 2018; 392 (10147): 593-606
65. Smith A., Howell D., Patmore R., Jack A. & Roman E. Incidence of Haematological Malignancy by Sub-Type: A Report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer* 2011; 105: 1684 – 1692.
66. Taicz M., Pérez G., Reijtman V., Mastroianni A., Escarra F., García E., Varela A., Gutter M., Romero J., Ghibaudi G., Gómez S. & Bologna R. Epidemiología y Factores de Internación Prolongada en Niños con Leucemia y Bacteriemia. Estudio de cohorte. *Rev. Chilena Infectol.* 2018; 35 (3): 233 – 238.
67. Tao L.-L., Zhai Y.-Z., Ding D., Yin W. H., Liu X.-P. & Yu G.-Y. The role of C/EBP- α expression in human liver and liver fibrosis and its relationship with autophagy. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* 2015; 8 (10), 13102–13107.
68. Tawana K., Drazer M., & Churpek J. Universal genetic testing for inherited susceptibility in children and adults with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia: are we there yet. *Leukemia.* 2018; 32(7): 1482-1492.
69. Valdés C., Campo M., Hernández J. & Borrego G. Un caso Clínico de Complicaciones Asociadas a la Leucemia Mieloide Aguda. *Rev. Ciencias Médicas de Pinar del Río.* 2017; vol 21(4): 156 – 561.
70. Walter R., Othus M., Burnett A., Löwenberg B., Kantarjian H., Ossenkopppele G. & Estey E. Significance of FAB Subclassification of “Acute Myeloid Leukemia, NOS” in the 2008 WHO Classification: Analysis of 5848 Newly Diagnosed Patients. *Blood.* 2013; 121 (13): 2424 –2431.
71. Wang B.-H., Li Y.-H. & Yu L. Genomics-based Approach and Prognostic Stratification Significance of Gene Mutations in Intermediate-risk Acute Myeloid Leukemia. 2015.

72. Zhang Q., Bai S. & Vance G. H. Pruebas genéticas moleculares para FLT3, NPM1 y CEBPA en leucemia mieloide aguda. En *Methods in Molecular Biology*. 2013; 999: 105-121.
73. Zhang Y., Wang F., Chen X., Liu W., Fang J. & Wang M. Mutation Profiling of 16 Candidate Genes in de Novo Acute Myeloid Leukemia Patients. *Frontiers of Medicine*. 2018; 13 (2): 229 – 237.
74. Cherian, S., & Soma, L. A. (2021). How i diagnose minimal/measurable residual disease in b lymphoblastic leukemia/lymphoma by flow cytometry. *American Journal of Clinical Pathology*, 155(1), 38–54. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa242>
75. D’Arena, G., Vitale, C., Rossi, G., Coscia, M., Omedè, P., D’Auria, F., Statuto, T., Valvano, L., Ciolli, S., Gilestro, M., Molica, S., Bellesi, S., Topini, G., Panichi, V., Autore, F., Innocenti, I., Musto, P., Deaglio, S., Laurenti, L., & Del Vecchio, L. (2018). CD200 included in a 4-marker modified Matutes score provides optimal sensitivity and specificity for the diagnosis of chronic lymphocytic leukaemia. *Hematological Oncology*, 36(3), 543–546. <https://doi.org/10.1002/hon.2510>
76. Li, W. (2022). Flow Cytometry in the Diagnosis of Leukemias. In *Leukemia* (pp. 53–77). Exon Publications. <https://doi.org/10.36255/exon-publications-leukemia-flow-cytometry>
77. Mannelli, F., Ponziani, V., Bencini, S., Bonetti, M. I., Benelli, M., Cutini, I., Gianfaldoni, G., Scappini, B., Pancani, F., Piccini, M., Rondelli, T., Caporale, R., Gelli, A. M. G., Peruzzi, B., Chiarini, M., Borlenghi, E., Spinelli, O., Giupponi, D., Zanghì, P., ... Bosi, A. (2017). CEBPA–double-mutated acute myeloid leukemia displays a unique phenotypic profile: A reliable screening method and insight into biological features. *Haematologica*, 102(3), 529–540. <https://doi.org/10.3324/hmaematol.2016.151910>
78. Marcolin, R., Guolo, F., Minetto, P., Clavio, M., Manconi, L., Ballerini, F., Carli, A., Passannante, M., Colombo, N., Carminati, E., Pugliese, G., Tedone, E., Contini, P., Mangerini, R., Kunkl, A., Miglino, M., Cagnetta, A., Cea, M., Gobbi, M., & Lemoli, R. M. (2019). A simple cytofluorimetric score may optimize testing for biallelic CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 86(June), 106223. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2019.106223>
79. Tsagarakis, N. J., Papadimitriou, S. I., Pavlidis, D., Marinakis, T., Kostopoulos, I. V., Stiakaki, E., Polychronopoulou, S., & Paterakis, G. (2019). Flow cytometric predictive scoring systems for common fusions ETV6/RUNX1, BCR/ABL1, TCF3/PBX1 and rearrangements of the KMT2A gene, proposed for the initial cytogenetic approach in cases of B-acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Laboratory Hematology*, 41(3), 364–372. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12983>
80. Triantafilo, Nicolás, Sarmiento, Mauricio, Campbell, James, Rojas, Patricio, García, María José, Sandoval, Vicente, Bertín, Pablo, Ocqueteau, Mauricio, Risueño, María Concepcián, Rodríguez, Isabel, & Galleguillos, Mauricio. (2022). Actualización de resultados demográficos y terapéuticos de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda no promielocítica en el Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile. *Revista médica de Chile*, 150(5), 643-649. <https://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872022000500643>
81. Satoshi, Masahiro Sakaguchi, Iekuni Oh, Shinichi Kako, Takashi Toya, Yuho Najima, Noriko Doki, Junya Kanda, Junya Kuroda, Shinichiro Mori, Atsushi Satake, Kensuke Usuki, Toshimitsu Ueki, Nobuhiko Uoshima, Yutaka Kobayashi, Eri Kawata,

- Kenji Tajika, Yuhei Nagao, Katsuhiko Shono, Motoharu Shibusawa, Jiro Tadokoro, Kensuke Kayamori, Masao Hagihara, Hitoji Uchiyama, Naoyuki Uchida, Yasushi Kubota, Shinya Kimura, Hisao Nagoshi, Tatsuo Ichinohe, Saiko Kurosawa, Sayuri Motomura, Akiko Hashimoto, Hideharu Muto, Eriko Sato, Masao Ogata, Kenjiro Mitsuhashi, Jun Ando, Atsushi Marumo, Ikuko Omori, Yusuke Fujiwara, Kazuki Terada, Shunsuke Yui, Kunihiro Arai, Tomoaki Kitano, Miho Miyata, Akiyo Kurosawa, Ayumi Mizoguchi, Norio Komatsu, Takahiro Fukuda, Kazuteru Ohashi, Yoshinobu Kanda, Koiti Inokuchi, Hiroki Yamaguchi; Prognostic impact of CEBPA bZIP domain mutation in acute myeloid leukemia. *Blood Adv* 2022; 6 (1): 238–247. doi: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004292>
82. Taube F, Georgi JA, Kramer M, Stasik S, Middeke JM, Röllig C, Krug U, Krämer A, Scholl S, Hochhaus A, Brümmendorf TH, Naumann R, Petzold A, Mulet-Lazaro R, Valk PJM, Steffen B, Einsele H, Schaich M, Burchert A, Neubauer A, Schäfer-Eckart K, Schliemann C, Krause SW, Hänel M, Noppeney R, Kaiser U, Baldus CD, Kaufmann M, Herold S, Stölzel F, Sockel K, von Bonin M, Müller-Tidow C, Platzbecker U, Berdel WE, Serve H, Ehninger G, Bornhäuser M, Schetelig J, Thiede C; Study Alliance Leukemia (SAL). CEBPA mutations in 4708 patients with acute myeloid leukemia: differential impact of bZIP and TAD mutations on outcome. *Blood*. 2022 Jan 6;139(1):87-103. doi: 10.1182/blood.2020009680. PMID: 34320176.
83. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345–77.
84. Liao X, Fang J, Zhou D, Qiu K. CEBPA are independent good prognostic factors in pediatric acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol* [Internet]. 2021 Apr 27;40(2):258–68. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hon.2951>

ANEXO 1: Protocolo dilución muestras ADN.

- Muestra Sangre Completa 2b: [233,8 ng/μL]; pureza 1,94; integridad: +.

$$233,8 \text{ ng}/\mu\text{L} \times ? = 50 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 200 \mu\text{L}$$

$$? = 42,7 \mu\text{L}$$

- Tomar 42,7 μL de muestra y diluir a 200 μL. Para ello agregar 157,2 uL de agua molecular para una concentración final de 50 ng/μL. Por la concentración obtenida, tomar 2 μL de templado para obtener 100 ng/μL (según inserto *GoTaq Green Master Mix*).

ANEXO 2: Protocolo extracción ADN genómico por columna (*NucleoSpin Blood*).

- Añadir 200 μ L de muestra.
- Añadir 25 μ L de proteinasa K.
- Agregar 200 μ L de tampón B3 (detergente que permite la permeabilidad de la membrana).
- Agitar en vortex vigorosamente 30 segundos.
- Incubar 10 a 15 minutos a 70°C junto con tampón BE.
- Añadir 210 μ L de etanol absoluto.
- Agitar en vortex vigorosamente.
- Traspasar toda la muestra a la columna y añadir tubo colector.
- Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto en centrifuga *U-320R Boeco Germany (Lab- Tec)*.
- Eliminar y colocar otro tubo colector para añadir en columna 500 μ L de tampón W.
- Centrifugar nuevamente a 13.000 rpm por 1 minuto en centrifuga *U-320R Boeco Germany (Lab-Tec)*.
- Eliminar y colocar otro tubo colector para añadir en la columna 600 μ L de tampón B5.
- Centrifugar nuevamente a 13.000 rpm por 1 minuto en centrifuga *U-320R Boeco Germany (Lab-Tec)*.
- Eliminar y colocar otro tubo colector y añadir a la columna (tocando la membrana por todos los bordes) 50 μ L de tampón BE.
- Centrifugar nuevamente a 13.000 rpm por 1 minuto en centrifuga *U-320R Boeco Germany (Lab-Tec)*.
- Guardar concentrado de ADN del tubo colector y alicuotar 5 μ L en tubos eppendorf para PCR.

ANEXO 3: Protocolo extracción ADN genómico por perlas (*Precellys Lysing Kit*).

- Utilizar un tubo con perlas *Precellys Lysing Kit* (*bertin technologies*) y añadir 300 μ L de muestra
- Añadir 25 μ L de proteinasa K.
- Agregar 200 μ L de tampón B3 (detergente que permite la permeabilidad de la membrana).
- Homogeneizar en centrifuga *Precellys Evolution* (*bertin technologies*) a 6.500 rpm por 15 segundos cada 3 ciclos con pausas de 15 segundos.
- Envolver tubos con perlas en papel aluminio e incubar 15 minutos a 70°C junto a tampón BE.
- Añadir 210 μ L de etanol absoluto.
- Agitar en vortex vigorosamente.
- Traspasar toda la muestra a la columna y añadir tubo colector.
- Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto.
- Eliminar y colocar otro tubo colector para añadir en columna 500 μ L de tampón W.
- Centrifugar nuevamente a 13.000 rpm por 1 minuto.
- Eliminar y colocar otro tubo colector para añadir en la columna 600 μ L de tampón B5.
- Centrifugar nuevamente a 13.000 rpm por 1 minuto.
- Eliminar y colocar otro tubo colector y añadir a la columna (tocando la membrana por todos los bordes) 50 μ L de tampón BE.
- Centrifugar nuevamente a 13.000 rpm por 1 minuto.
- Guardar concentrado de ADN del tubo colector y alicuotar 5 μ L en tubos eppendorf para PCR.

ANEXO 4: Protocolo extracción ADN genómico por Sales o Micrométodo (RBAC).

- Añadir 300 μ L de muestra.
- Agregar 300 μ L de Yoduro de Sodio.
- Mezclar en vortex vigorosamente por 20 segundos.
- Añadir 28,8 mL de Cloroformo y 1,2 mL de Alcohol Isoamílico (24:1), luego agregar de esta alicuotar 600 μ L.
- Mezclar en vortex por 20 segundos.
- Centrifugar a 12000 rpm por 8 minutos.
- Remover la fase superior (ADN) y pasar a segundo tubo estéril rotulado 400 μ L.
- Agregar 400 μ L de Isopropanol 70% y e incubar a temperatura ambiente por 3 minutos. A cada minuto mezclar un par de veces.
- Centrifugar 12000 rpm por 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante mediante aspiración.
- Lavar el sedimento con 500 μ L de Isopropanol y mezclar por inversión de inmediato.
- Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos.
- Remover el sobrenadante por aspiración y dejar secar al aire por 8 minutos de manera invertida sobre material absorbente.
- Agregar tampón TE 50 μ L y agitar en vortex.
- Incubar 10 minutos con papel absorbente en la tapa cerrado a 56°C.
- Alicuotar 5 μ L en un tubo eppendorf para PCR.

ANEXO 5: Protocolo dilución de partidores.

Para su dilución es necesario saber las concentraciones de cada partidor. Para tener una concentración de 100 μM de cada partidor, se deben tomar alícuotas diferentes (ver tabla 9).

Tabla 14. Partidores nuevos y diluciones requeridas.

Partidor	Cantidad requerida para 100 μM
P3F1	376 μL
PR1	413 μL
P4R2	303 μL

Una vez tomadas dichas alícuotas en tubos eppendorf para PCR, diluir 10 veces la solución madre de 100 μM para cada partidor a una concentración 10 μM (volumen final 100 μL). Para ello agregar 10 μL de cada partidor y agregar 90 μL de agua molecular.

ANEXO 6: Protocolo mix PCR (*GoTaq Green Master Mix*)

1. Mezcla partidores PP1F y PP1R:

Realizar mezclas de partidores sin DMSO, DMSO 3% y DMSO 8%. Para cada una de estas últimas 3 condiciones, probar temperaturas de alineamiento de 60, 62 y 64°C.

1a. Se realiza mezcla de partidores al 4x: Sin DMSO.

- 50 μ L de *GoTaq Green Master Mix*.
 - 2 μ L e partidor PP1F.
 - 2 μ L de partidor PP1R.
 - 38 μ L de Agua molecular para volumen final de 92 μ L.
- ✓ Añadir 23 μ L a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μ L de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μ L de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

1b. Se realiza mezcla de partidores al 4x: DMSO 3%.

- 50 μ L de *GoTaq Green Master Mix*.
 - 2 μ L e partidor PP1F.
 - 2 μ L de partidor PP1R.
 - 3 μ L de DMSO.
 - 35 μ L de agua molecular para volumen final de 92 μ L.
- ✓ Añadir 23 μ L a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μ L de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μ L de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

1c. Se realiza mezcla de partidores al 4x: DMSO 8%.

- 50 μ L de *GoTaq Green Master Mix*.
 - 2 μ L de partidor PP1F.
 - 2 μ L de partidor PP1R.
 - 8 μ L de DMSO.
 - 30 μ L de agua molecular para volumen final de 92 μ L.
- ✓ Añadir 23 μ L a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μ L de templado a 3 tubos PCR.

- ✓ Añadir 2 μL de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

2. Mezcla partidores PP2F y PP2R:

2a. Se realiza mezcla de partidores al 4x: Sin DMSO.

- 50 μL de *GoTaq Green Master Mix*.
- 2 μL de partidador PP2F.
- 2 μL de partidador PP2R.
- 38 μL de Agua molecular para volumen final de 92 μL .

- ✓ Añadir 23 μL a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μL de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μL de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

2b. Se realiza mezcla de partidores al 4x: DMSO 3%.

- 50 μL de *GoTaq Green Master Mix*.
- 2 μL de partidador PP2R.
- 2 μL de partidador PP2F.
- 3 μL de DMSO.
- 35 μL de agua molecular para volumen final de 92 μL .

- ✓ Añadir 23 μL a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μL de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μL de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

2c. Se realiza mezcla de partidores al 4x: DMSO 8%.

- 50 μL de *GoTaq Green Master Mix*.
- 2 μL de partidador PP2R.
- 2 μL de partidador PP2F.
- 8 μL de DMSO.
- 30 μL de agua molecular para volumen final de 92 μL .

- ✓ Añadir 23 μL a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μL de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μL de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

3. Mezcla partidores P3F1 y P4R2:

3a. Se realiza mezcla de partidores al 4x: Sin DMSO.

- 50 μ L de *GoTaq Green Master Mix*.
 - 2 μ L de partidador P3F1.
 - 2 μ L de partidador P4R2.
 - 38 μ L de Agua molecular para volumen final de 92 μ L.
- ✓ Añadir 23 μ L a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μ L de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μ L de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

3b. Se realiza mezcla de partidores al 4x: DMSO 3%.

- 50 μ L de *GoTaq Green Master Mix*.
 - 2 μ L de partidador P3F1.
 - 2 μ L de partidador P4R2.
 - 3 μ L de DMSO.
 - 35 μ L de agua molecular para volumen final de 92 μ L.
- ✓ Añadir 23 μ L a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μ L de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μ L de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

3c. Se realiza mezcla de partidores al 4x: DMSO 8%.

- 50 μ L de *GoTaq Green Master Mix*.
 - 2 μ L de partidador P3F1.
 - 2 μ L de partidador P4R2.
 - 8 μ L de DMSO.
 - 30 μ L de agua molecular para volumen final de 92 μ L.
- ✓ Añadir 23 μ L a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μ L de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 μ L de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

4. Mezcla partidores P3F1 y PR1:

4a. Se realiza mezcla de partidores al 4x: Sin DMSO.

- 50 uL de *GoTaq Green Master Mix*.
 - 2 uL de partidador P3F1.
 - 2 uL de partidador PR1.
 - 38 uL de Agua molecular para volumen final de 92 uL.
- ✓ Añadir 23 uL a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

4b. Se realiza mezcla de partidores al 4x: DMSO 3%.

- 50 uL de *GoTaq Green Master Mix*.
 - 2 uL de partidador P3F1.
 - 2 uL de partidador PR1.
 - 3 uL de DMSO.
 - 35 uL de agua molecular para volumen final de 92 uL.
- ✓ Añadir 23 uL a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

4c. Se realiza mezcla de partidores al 4x: DMSO 8%.

- 50 uL de *GoTaq Green Master Mix*.
 - 2 uL de partidador P3F1.
 - 2 uL de partidador PR1.
 - 8 uL de DMSO.
 - 30 uL de agua molecular para volumen final de 92 uL.
- ✓ Añadir 23 uL a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

5. Mezcla PP1F y P4R2:

5a. Se realiza mezcla de partidores al 4x: Sin DMSO.

- 50 uL de *GoTaq Green Master Mix*.
 - 2 uL de partidador PP1F.
 - 2 uL de partidador P4R2.
 - 38 uL de Agua molecular para volumen final de 92 uL.
- ✓ Añadir 23 uL a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

5b. Se realiza mezcla de partidores al 4x: DMSO 3%.

- 50 uL de *GoTaq Green Master Mix*.
 - 2 uL de partidador PP1F.
 - 2 uL de partidador P4R2.
 - 3 uL de DMSO.
 - 35 uL de agua molecular para volumen final de 92 uL.
- ✓ Añadir 23 uL a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

5c. Se realiza mezcla de partidores al 4x: DMSO 8%.

- 50 uL de *GoTaq Green Master Mix*.
 - 2 uL de partidador PP1F.
 - 2 uL de partidador P4R2.
 - 8 uL de DMSO.
 - 30 uL de agua molecular para volumen final de 92 uL.
- ✓ Añadir 23 uL a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

6. Mezcla partidores PP1F y PP2R:

6a. Se realiza mezcla de partidores al 4x: Sin DMSO.

- 50 uL de *GoTaq Green Master Mix*.

- 2 uL de partidor PP1F.
- 2 uL de partidor PP2R.
- 38 uL de Agua molecular para volumen final de 92 uL.
- ✓ Añadir 23 uL a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

6b. Se realiza mezcla de partidores al 4x: DMSO 3%.

- 50 uL de *GoTaq Green Master Mix*.
- 2 uL de partidor PP1F.
- 2 uL de partidor PP2R.
- 3 uL de DMSO.
- 35 uL de agua molecular para volumen final de 92 uL.
- ✓ Añadir 23 uL a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

6c. Se realiza mezcla de partidores al 4x: DMSO 8%.

- 50 uL de *GoTaq Green Master Mix*.
- 2 uL de partidor PP1F.
- 2 uL de partidor PP2R.
- 8 uL de DMSO.
- 30 uL de agua molecular para volumen final de 92 uL.
- ✓ Añadir 23 uL a cada uno de los 4 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de templado a 3 tubos PCR.
- ✓ Añadir 2 uL de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).

ANEXO 7: Protocolo electroforesis en gel de agarosa.

1. Integridad del ADN genómico:

- Añadir 130 mL de tampón TAE en matraz Erlenmeyer de 200 mL.
- Añadir a la solución anterior 1,3 gramos de agarosa.
- Agitar para diluir grumos y calentar la solución en microondas hasta conseguir una solución clara y sin partículas.
- Enfriar hasta 55°C y añadir 5 uL tinción de ácidos nucleicos según *Fermelo Biotec*.
- Añadir a molde y colocar peine para formar los pocillos.
- Una vez solidificada la solución, retirar el peine y llenar la cámara electroforética con tampón TAE. Colocar el gel cuidando la orientación de los pocillos hacia el polo negativo.
- Cargar 5 uL de muestra junto a 1 uL de tampón de carga y 5 uL de marcador de peso molecular (utilizar un marcador de peso molecular de *maestrogen* de 250 pb a 10 kb con 13 bandas).
- Colocar la cubierta del aparato de electroforesis en los terminales de los electrodos e insertar las clavijas de los cables cada una con su respectivo color.
- Someter a un campo eléctrico de 60 voltios por 40 minutos.
- Luego de terminada la electroforesis, apagar la fuente de corriente, desconectar los cables, sacar la cubierta y revelar el gel.

2. Integridad del templado obtenido de PCR:

- Añadir 130 mL de tampón TAE en matraz Erlenmeyer de 200 mL.
- Añadir a la solución anterior 1,3 gramos de agarosa.
- Agitar para diluir grumos y calentar la solución en microondas hasta conseguir una solución clara y sin partículas.
- Enfriar hasta 55°C y añadir 5 uL tinción de ácidos nucleicos según *Fermelo Biotec*.
- Añadir a molde y colocar el peine para formar los pocillos.
- una vez solidificada la solución, retirar el peine y llenar la cámara electroforética con tampón TAE. Colocar el gel cuidando la orientación de los pocillos hacia el polo negativo.
- Cargar 25 uL de muestra junto a 5 uL de tampón de carga y 5 uL de marcador de peso molecular (utilizar un marcador de peso molecular de *maestrogen* de 250 pb a 10 kb con 13 bandas).
- Colocar la cubierta del aparato de electroforesis en los terminales de los electrodos e insertar las clavijas de los cables cada una con su respectivo color.
- Someter a un campo eléctrico de 60 voltios por 2 horas
- Luego de terminada la electroforesis, apagar la fuente de corriente, desconectar los cables, sacar la cubierta y revelar el gel.

ANEXO 8: Geles de integridad ADN genómico.

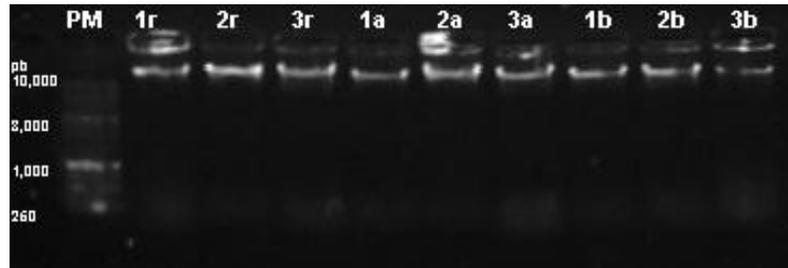


Figura 19. Gel integridad Sangre Completa por técnica de Sales.

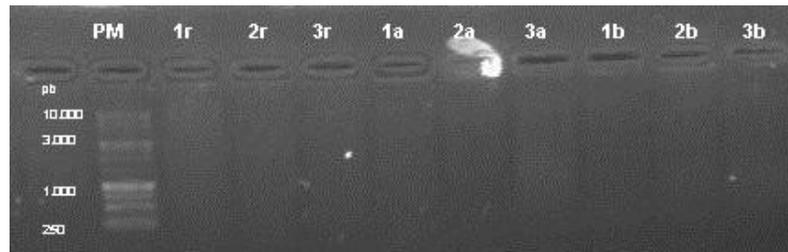


Figura 20. Gel integridad Sangre Completa por técnica de Columna.

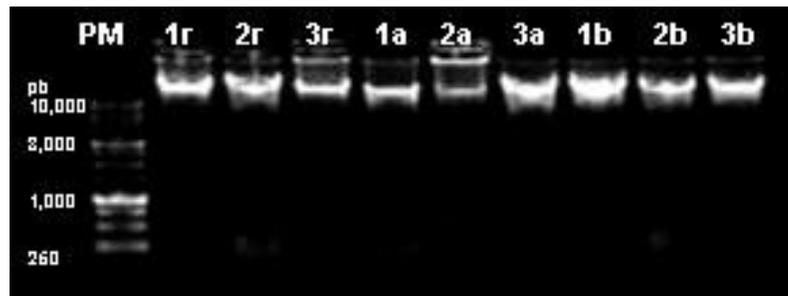


Figura 21. Gel integridad Concentrado de Leucocitos por técnica de Sales.

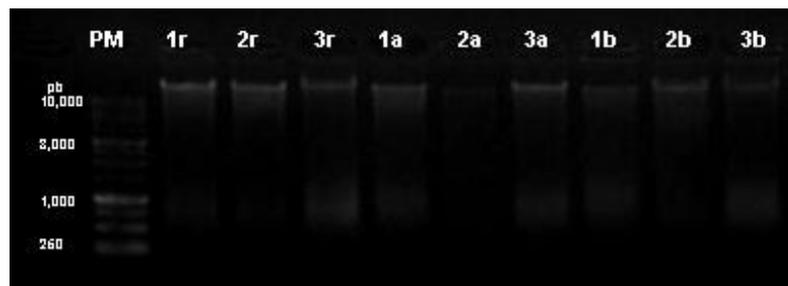


Figura 22. Gel integridad Concentrado de Leucocitos por técnica de Columna.

ANEXO 9: Perfil clínico general de los pacientes con LMA.

Tabla 16. Tabulación de perfil clínico general de pacientes con LMA con pronóstico adverso y favorable.

Parámetros	Paciente con LMA con pronóstico adverso		Paciente con LMA con pronóstico favorable
Blastos en médula ósea y/o biopsia	>20% (OMS)		<5% en tratamiento
Recuento serie plaquetaria	Trombocitopenia	<20.000/uL	>100.000/uL
Recuento serie blanca	Leucocitosis	>30.000/uL	RAN >1.000/uL
	Hiperleucocitosis	>100.000/uL	
Hemoglobina	< 7,5 g/dL		>10 g/dL

ANEXO 10. protocolo preparación de muestras para secuencia

- Los requerimientos para secuenciar producto de PCR son mínimo 15 ul de producto purificado y en agua, a una concentración mínima de 15 ng/ul.
- Si es producto sin purificar se solicitan 30-50 ul de producto de PCR único en un tubo de 1.5 ml* , con el costo de purificación de 1000 pesos por muestra (*si las muestras para purificar vienen en formato distinto al tubo de 1.5 ml se agregará un cargo de 1.000 pesos).
- El volumen depende de la intensidad que se observe en el gel de agarosa, a menor intensidad mayor volumen de muestra para purificar.
- El servicio no purifica desde gel.
- Los partidores deben venir a 5 uM** y un volumen mínimo de 5 ul que alcanza para 3 reacciones (**el partidador se utiliza a la misma concentración que viene , el servicio no diluye si éste se viene a una concentración distinta, y no se hace responsable si por este motivo la señal tiene algún problema).
- Con respecto a la concentración, el servicio cuantifica las muestras antes de procesarlas.
- El rango promedio de lectura es entre 600 – 700 pb y depende de la calidad de la muestra.
- Los resultados se entregan en formato .ab1, .seq.y phd.
- Si el usuario lo solicita se puede enviar en formato pdf.
- El tiempo de entrega de resultados es máximo 4 días hábiles hasta 30 muestras aprox., mayor cantidad de muestras puede aumentar el tiempo de entrega.
- Por la situación sanitaria las muestras y los partidores deben venir dentro de una bolsa plástica y el formulario enviado por correo electrónico. No se recibirán formulario en papel.
- Para entrega presencial de muestras la recepción es los lunes, martes y jueves de 11:30 a 12:30 horas. La entrega es en Facultad ciencias Biológicas , edificio 210 piso-1.
- Para envío por correo la dirección es Pontificia Universidad Católica de Chile, Av.L.B.O'Higgins 340, 223549243 , Servicio de Secuenciación.

- No es necesario enviar las muestras en frío, se puede enviar en un sobre bien acolchado. Recomiendo correos de Chile servicio 24 AM. Si tiene otro sistema de envío no hay problema.
- El costo por reacción, esto es una muestra purificada y un partidor es de 4.000 pesos (valor total exento de IVA). Existiendo un descuento del 20% si al mes se envían sobre 96 reacciones.

ANEXO 11. Protocolo de extracción de ADN utilizando el kit Promega Wizard®

- Se alícuota 300uL de sangre completa o bien de aspirado de médula ósea.
- Se agregan 900uL de solución lisante de membrana citoplasmática para romper los glóbulos rojos.
- Se mezcla por inversión y se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Luego se centrifuga la muestra a 13000g por 20 segundos.
- Se descarta el sobrenadante y se realiza un vortex al pellet.
- Se añaden 300uL de solución lisante de membrana nuclear y luego mezclar por inversión.
- Añadir 100uL de solución precipitante de proteínas y realizar un vortex de 20 segundos.
- Centrifugar a 13000g por 3 minutos.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo con 300uL de isopropanol y mezclar.
- Centrifugar a 13000g por 1 minuto.
- Descartar el sobrenadante y agregar 300uL de etanol al 70%.
- Centrifugar a 13000g por 1 minuto.
- Aspirar el etanol y dejar secar al aire por 10-15 minutos.
- Rehidratar el ADN con 100uL de solución rehidratante durante 1 hora a 65°C o dejar toda la noche a 4°C.

ANEXO 12: Protocolo para la identificación del gen CEBP α

Logo institucional	PROCEDIMIENTO	Código:	
		Fecha:	
	Procedimiento para el estudio de la región bZIP del gen CEBPA en pacientes con LAM	Versión:	
		Página:	

1. ALCANCE

Se documenta el siguiente procedimiento para la realización de la técnica de amplificación de la región bZIP del gen CEBPA, a partir de muestras de médula ósea o sangre periférica, mediante PCR convencional en el laboratorio de , hospital de .

2. FUNDAMENTO

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es una técnica de biología molecular para la clonación y cuantificación acelar de material genético, ADN de cualquier especie.

La técnica utilizada en el laboratorio de Diagnóstico Molecular, consta de amplificación de la región bZIP del gen CEBP α , utilizando partidores para identificar la región mencionada específicamente.

3. PROCEDIMIENTO

1. El profesional encargado de llevar a cabo la técnica deberá vestir todos los elementos de protección personal propios del área
2. Aplicar la técnica de extracción de ADN (kit Promega Wizard®)
 - a) Se alícuota 300 μ L de sangre completa o bien de aspirado de médula ósea.
 - b) Se agregan 900 μ L de solución lisante de membrana citoplasmática para romper los glóbulos rojos.
 - c) Se mezcla por inversión y se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos.
 - d) Luego se centrifuga la muestra a 13000g por 20 segundos.
 - e) Se descarta el sobrenadante y se realiza un vortex al pellet.
 - f) Se añaden 300 μ L de solución lisante de membrana nuclear y luego mezclar por inversión.
 - g) Añadir 100 μ L de solución precipitante de proteínas y realizar un vortex de 20 segundos.
 - h) Centrifugar a 13000g por 3 minutos.
 - i) Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo con 300 μ L de isopropanol y mezclar.
 - j) Centrifugar a 13000g por 1 minuto.
 - k) Descartar el sobrenadante y agregar 300 μ L de etanol al 70%.
 - l) Centrifugar a 13000g por 1 minuto.
 - m) Aspirar el etanol y dejar secar al aire por 10-15 minutos.
 - n) Rehidratar el ADN con 100 μ L de solución rehidratante durante 1 hora a 65°C o dejar toda la noche a 4°C.

Logo institucional	PROCEDIMIENTO	Código:	
		Fecha:	
	Procedimiento PCR convencional para la amplificación de la región bZIP	Versión:	
		Página:	

3. El profesional encargado de llevar a cabo la técnica deberá vestir todos los elementos de protección personal propios del área
4. Antes de iniciar el trabajo:
 - a. Aplicar luz UV la sala de carga durante 10 minutos antes de ingresar
 - b. Desinfectar gabinete de bioseguridad con etanol al 70%.
 - c. Limpiar toda la superficie del gabinete con DNAsaZap para evitar degradación del ADN por acción de DNAsas.
 - d. Incorporar todo el material a utilizar (puntas, guantes, lapices, tubos de reacción, gradilla) previa limpieza con etanol al 70%.
 - e. Cerrar cámara de bioseguridad y aplicar luz UV por 20 minutos.
 - f. Pasado los 20 minutos y una vez apagada automáticamente la luz UV, prender flujo de aire, abrir gabinete y esperar que recircule el ozono generado por luz UV.
5. Incorporar a la cámara los reactivos sin perder la cadena de frío que va a utilizar para montar la reacción:
 - a. *GoTaq Green Master Mix*.
 - b. DMSO
 - c. Agua grado biología molecular.
6. Rotular los tubos de reacción a utilizar, considerando:
 - a. Control negativo agua (NTC)
 - b. Muestras
7. Agregar a cada tubo de reacción los volúmenes de los reactivos enumerados anteriormente, según el siguiente protocolo:

Se realiza mezcla de cebadores al 4x: DMSO 3%.

 - 50 μ L de *GoTaq Green Master Mix*.
 - 2 μ L de cebador PP2R.
 - 2 μ L de cebador PP2F.
 - 3 μ L de DMSO.
 - 35 μ L de agua molecular para volumen final de 92 μ L.
 - ✓ Añadir 23 μ L a cada uno de los 4 tubos PCR.
 - ✓ Añadir 2 μ L de templado a 3 tubos PCR.
 - ✓ Añadir 2 μ L de agua molecular a quinto tubo PCR (control negativo).
8. Completado el proceso, retirarse del área de carga (eliminar EPP antes de salir de la sala) y proceder a la programación del termociclador en sala de amplificación.

Logo institucional	PROCEDIMIENTO	Código:	
		Fecha:	
	Procedimiento para el estudio de la región bZIP del gen CEBPA en pacientes con LAM	Versión:	
		Página:	

9. Encender el termociclador y ajustar el programa de acuerdo a la siguiente tabla:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Denaturación inicial	95°C	3 minutos	1
Denaturación	95°C	35 segundos	30
Alineamiento	60, 62, 64°C	30 segundos	
Extensión	72°C	35 segundos	
Extensión final	72°C	7 minutos	1

10. Los productos de amplificación se visualizan en una electroforesis siguiendo los siguientes pasos

- Añadir 130 mL de tampón TAE en matraz Erlenmeyer de 200 mL.
- Añadir a la solución anterior 1,3 gramos de agarosa.
- Agitar para diluir grumos y calentar la solución en microondas hasta conseguir una solución clara y sin partículas.
- Enfriar hasta 55°C y añadir 5 µL tinción de ácidos nucleicos según Fermelo Biotec.
- Añadir a molde y colocar el peine para formar los pocillos.
- una vez solidificada la solución, retirar el peine y llenar la cámara electroforética con tampón TAE. Colocar el gel cuidando la orientación de los pocillos hacia el polo negativo.
- Cargar 5 µL de muestra junto a 5 µL de tampón de carga y 5 µL de marcador de peso molecular (utilizar un marcador de peso molecular de maestrogen de 250 pb a 10 kb con 13 bandas).
- Colocar la cubierta del aparato de electroforesis en los terminales de los electrodos e insertar las clavijas de los cables cada una con su respectivo color.
- Someter a un campo eléctrico de 60 voltios por 2 horas
- Luego de terminada la electroforesis, apagar la fuente de corriente, desconectar los cables, sacar la cubierta y revelar el gel.
- El gel será revelado en un cámara de lectura con luz UV, desde donde se podrán adquirir imágenes de la cámara fotográfica del equipo con la protección adecuada.

11. El envío de las muestras a secuenciar, se realiza siguiendo los siguientes pasos:

- Los requerimientos para secuenciar producto de PCR son mínimo 15 µl de producto purificado y en agua, a una concentración mínima de 15 ng/µl.
- Si es producto sin purificar se solicitan 30-50 µl de producto de PCR único en un tubo de 1.5 ml* , con el costo de purificación de 1000 pesos por muestra (*si las muestras

Logo institucional	PROCEDIMIENTO	Código:	
		Fecha:	
	Procedimiento PCR convencional para la amplificación de la región bZIP	Versión:	
		Página:	

para purificar vienen en formato distinto al tubo de 1.5 ml se agregará un cargo de 1.000 pesos).

- c) El volumen depende de la intensidad que se observe en el gel de agarosa, a menor intensidad mayor volumen de muestra para purificar.
- d) El servicio no purifica desde gel.
- e) Los partidores deben venir a 5 μ M** y un volumen mínimo de 5 μ l que alcanza para 3 reacciones (**el partidador se utiliza a la misma concentración que viene , el servicio no diluye si éste se viene a una concentración distinta, y no se hace responsable si por este motivo la señal tiene algún problema).
- f) Con respecto a la concentración, el servicio cuantifica las muestras antes de procesarlas.
- g) El rango promedio de lectura es entre 600 – 700 pb y depende de la calidad de la muestra.
- h) Los resultados se entregan en formato .ab1, .seq.y phd.
- i) Si el usuario lo solicita se puede enviar en formato pdf.
- j) El tiempo de entrega de resultados es máximo 4 días hábiles hasta 30 muestras aprox., mayor cantidad de muestras puede aumentar el tiempo de entrega.
- k) Por la situación sanitaria las muestras y los partidores deben venir dentro de una bolsa plástica y el formulario enviado por correo electrónico. No se recibirán formulario en papel.
- l) Para entrega presencial de muestras la recepción es los lunes, martes y jueves de 11:30 a 12:30 horas. La entrega es en Facultad ciencias Biológicas , edificio 210 piso-1.
- m) Para envío por correo la dirección es Pontificia Universidad Católica de Chile, Av.L.B.O'Higgins 340, 223549243 , Servicio de Secuenciación

12. Al recibir los resultados de secuenciación por correo electrónico, se cargan en el programa Bioedit, para revisar visualmente los electroferogramas y seleccionar la secuencia omitiendo los extremos de secuenciación.
13. Para analizar la secuencia obtenida de cada muestra se utiliza el programa Clustal Omega, realizando un match con la secuencia wt de la región bZIP del gen CEBPA.
14. Se registran los resultados, ya sea sin mutación o mutado indicando la posición del nucleótido.
15. Se emite un informe siguiendo la estructura de formato del laboratorio