

7. DISCUSIÓN

La primera parte del proyecto consistió en la obtención de un control positivo mediante técnicas de clonación molecular. *E. coli*, a diferencia de otras bacterias que presentan competencia natural como *Bacillus subtilis* o *Haemophilus influenzae*, no presenta dicha capacidad y se requieren de métodos químicos o electrofísicos (electroporación) para inducirle la capacidad de competencia y poder transformarla en el laboratorio (Lorenz M 1994, Tefan LY 2007, Snyder L 1994).

Al inicio del presente trabajo se probó el método químico convencional con una concentración 100mM de CaCl_2 , sin embargo los resultados obtenidos fueron poco satisfactorios. Por ello, se optó por un protocolo que consiste en una modificación del método convencional de CaCl_2 reportado por Zhiming Tu et al, (2005).

Entre las modificaciones presentes en dicho protocolo destacan el empleo de una solución más compleja llamada TB (Transformation Buffer of CaCl_2 ver sección 9.1 de Anexos), la sustitución del medio LB por el medio S.O.C. y la adición de DMSO o PEG₈₀₀₀.

La eficiencia en la transformación es muy importante y puede ser modificada por diferentes factores. Uno de ellos es el período de crecimiento en el cual se induce la competencia. Es importante que las bacterias se encuentren en la primera fase del crecimiento logarítmico. En este estudio se empleó un valor de OD_{600} 0.2-0.4 para las dos cepas lo cual equivale a las primeras 2 a 3 horas de incubación con agitación constante a 37°C. Valores mayores o menores de los OD_{600} considerados como óptimos darán resultados negativos en la inducción de competencia y transformación (Tang X 1994).

Otro factor relevante es la concentración de CaCl_2 . Las concentraciones empleadas en la mayoría de protocolos son de 50-100 mM. Sin embargo, en el protocolo empleado la concentración reportada como ideal es de 75mM. La solución TB contiene otros cationes divalentes (Mn^{2+}) que contribuyen al papel que desempeña CaCl_2 . El mecanismo exacto por el cual se induce competencia con este compuesto se desconoce. Sin embargo, una explicación plausible sostiene que la membrana bacteriana es permeable sólo a los iones cloruro pero no a los iones calcio. De manera que los iones cloruro rodeados de moléculas de agua entran a la célula. La entrada de agua de esta forma causa un hinchamiento en la membrana lo cual es necesario para la entrada de DNA (Tu Z 2005). Por su parte, los iones divalentes no atraviesan la membrana permaneciendo fuera de ella y estabilizando las cargas negativas del plásmido (Tefan LY 2007). En cuanto a la entrada de DNA, parece ser que se forman poros en los que intervienen algunos elementos energéticos bacterianos como polifosfato, polihidroxibutirato junto con los iones Ca^{2+} (Castuma CE 1995).

Por su parte, la adición de DMSO también afecta la eficiencia en forma positiva ya que su presencia parece estabilizar tanto a la membrana para aumentar su permeabilidad, como a la molécula de DNA durante su entrada a la célula (Tefan LY 2007). El medio de cultivo puede igualmente afectar la eficiencia de transformación. S.O.C. es un medio más rico que LB (Sección 9.1 de Anexos) lo cual resulta en un crecimiento más rápido de las bacterias (Tu Z 2005).

No se sabe exactamente si el choque térmico a 42°C es crucial o no para la entrada del DNA a la célula. Cuando *E. coli* es sometida a esa temperatura, genes de respuesta a choque térmico se expresan lo cual permite a las bacterias sobrevivir a esas temperaturas. Sin embargo,

temperaturas superiores a 42°C disminuyen la capacidad de las bacterias para captar DNA y temperaturas aún mayores provocarían su muerte. Sea cual sea la razón, se recomienda el choque térmico a exactamente 42°C durante 90 segundos (Tu Z 2005).

En este trabajo la eficiencia de transformación obtenida con pAULO-T315I para XL1-blue fue de 1.6×10^5 ufc/ μ g y para DH5 α fue de 3.8×10^6 ufc/ μ g. De manera que la eficiencia con esta última cepa es casi 24 veces mayor que la obtenida con XL1-blue, razón por la cual los trabajos de minilizados y extracción de plásmido se hicieron en colonias de DH5 α . Estos resultados contrastan con los reportados por Zhimming Tu et al, (2005) ya que éstos indican una eficiencia mayor para XL1-blue que para DH5 α (8.18×10^8 y 4.15×10^8 ufc/ μ g con pUC18 respectivamente).

Por otro lado, para ambas cepas de *E. coli*, la eficiencia obtenida con pAULO-T315I es menor que la obtenida con el control pUC18. La cantidad empleada de plásmido fue la misma para los dos casos, de manera que la razón más plausible de la diferencia en eficiencias es el tamaño de la molécula de DNA. Por un lado pUC18 es un plásmido de 2686 pb, mientras que pAULO-T315I contiene 17949 pb, es decir, pAULO es casi 6 veces más grande que pUC18. Es posible que esta diferencia de tamaño haga de pAULO-T315I un plásmido difícil de entrar a la célula además de ser mucho más delicado para manipular que a final de cuentas provoca una disminución en la eficiencia de la transformación.

Otra etapa crucial en este trabajo fue la identificación de una clona transformada con el plásmido de interés. Para lo anterior se requirió de numerosos minilizados para finalmente identificar la colonia con la cual se harían las posteriores extracciones, que en este caso fue la clona identificada como 4 de DH5 α .

Durante la elaboración de minilizados es muy importante preparar la solución II siempre fresca cada vez que se va a emplear ya que precipita después de algunas horas (Sambrook 1990). A pesar de que el método por lisis alcalina es relativamente sencillo algunos problemas se pueden presentar. El más común consiste en que muchas veces quienes hacen minilizados por primera vez pueden no encontrar ningún plásmido. Esto se debe a que no se tuvieron las precauciones necesarias durante el procedimiento, sobre todo cuando se elimina el etanol después de precipitar el DNA.

La amplificación del plásmido obtenido de la lisis alcalina permite obtener resultados contundentes de la presencia del plásmido en cuestión y de la factibilidad de emplearlo como control positivo para el método. Por ello fue necesario realizar numerosas amplificaciones del mismo para cerciorarse de la reproducibilidad del método por ARMS-PCR. Por otra parte, sólo para comprobar la presencia de los productos de amplificación correspondientes y su caracterización se hicieron digestiones como se comenta en la sección 6.5 de Resultados.

Sin embargo, es menester recordar que la digestión de los productos de amplificación posterior a la reacción por ARMS-PCR no es necesaria ya que el método está diseñado para que ocurra amplificación sólo cuando están presentes las secuencias específicas que reconocen a los primers correspondientes permitiendo así el inicio de la polimerización por la Taq-polimerasa.

Para lograr una correcta amplificación, el diseño de los primers es muy importante en ARMS-PCR. De hecho, la secuencia de los oligonucleótidos así como su combinación es lo que determina en gran medida el éxito de un protocolo para PCR, además de optimizar los demás factores como número de ciclos, temperatura de hibridación, concentración de dNTPs, etc.

Como se comentó en la sección 1.4 de Introducción, la presencia de mutaciones intencionales en el extremo 3' es crucial. Los dos oligonucleótidos específicos empleados en este método presentan una sustitución del segundo nucleótido del extremo 3', mientras que el último nucleótido en 3' corresponde al afectado por la mutación que provoca el cambio de codón de Treonina→Isoleucina. La secuencia del oligonucleótido específico para el alelo T (Treonina) es 5'AGCCCCCGTTCTATATCATCTC3' en el cual el nucleótido T ocupa la segunda posición en el extremo 3'. Esta base (T) fue introducida en lugar de A para crear un desajuste de bases T/T (primer/DNA).

Lo mismo sucede en la secuencia del oligonucleótido específico para Isoleucina: 5'AGCCCCCGTTCTATATCATCTT3', donde T en segunda posición desde el extremo 3' también es añadida en lugar de A creando así un error de apareamiento T/T (primer/DNA). Como se explicó previamente en la Introducción, la presencia de estos errores de apareamiento en el extremo 3' de los oligonucleótidos, curiosamente permite mayor especificidad y discriminación por parte de la Taq-DNA polimerasa bajo condiciones normales de reacción, de manera que sólo el oligonucleótido específico puede elongarse. Esto es posible gracias a la falta de actividad de corrección de esta enzima.

La selección del desajuste de bases T/T se debió en gran parte a que los errores de apareamiento A/A, C/T y T/T (el primero es un desajuste purina/purina y los dos últimos pirimidina/pirimidina) son más refractarios (permiten más especificidad, mayor discriminación) por la Taq polimerasa que G/T, T/G, A/C o C/A, los cuales son todos desajustes purina/pirimidina (Newton CR 1989, Rolfs A 1992).

Uno de los pasos de mayor importancia para cada ciclo en una reacción de PCR es la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos. En este trabajo se probaron varias temperaturas, siendo las mejores 58°C y 60°C para los primers diseñados. A una temperatura de 60°C se obtuvieron bandas más intensas y definidas, de manera que todas las amplificaciones se hicieron con esta temperatura de hibridación.

Otro factor que afecta las reacciones de PCR es la concentración de MgCl₂. El Mg²⁺ es necesario para que la Taq-polimerasa vaya añadiendo dNTPs mientras va polimerizando. Sin iones magnesio no ocurre la polimerización. Una concentración adecuada de MgCl₂ va de 0.5 a 2.5 mM respecto del volumen final de la mezcla de reacción. En el presente trabajo se empleó una concentración de 1.5 mM. Baig SM et al, (2007) reportan buenos resultados empleando esta concentración de MgCl₂ en su protocolo con ARMS.

Por otra parte, una concentración adecuada de dNTPs también debe ser considerada como crucial para la optimización de un protocolo de PCR. Concentraciones ideales van de 100-200 µM (Rofls 1992). En el proyecto se empleó una concentración de 200µM. Los cuatro dNTPs deben estar en concentraciones equivalentes para evitar errores en la incorporación de los mismos durante la extensión por parte de la Taq.

Es recomendable que el número de ciclos no exceda los 40 ciclos. Si los ciclos son pocos pueden ser insuficientes para observar productos después de la reacción, pero si son demasiados se pueden producir productos inespecíficos. El número apropiado de ciclos varía entre 25 y 35 ciclos aunque depende de otros factores como la cantidad de DNA muestra o la especificidad de los oligonucleótidos (Rofls A 1992). El método para detectar la mutación T315I de ABL1 en este trabajo da buenos resultados con 35 ciclos.

La especificidad analítica se define como la habilidad de discriminar, medir o identificar una determinada sustancia o un determinado organismo en lugar de otros con gran similitud presentes en una misma muestra. Como se ha comentado a lo largo de este trabajo, el primer I es específico sólo para la mutación que origina la sustitución de una Treonina por una Isoleucina. El primer T por su parte, es específico para el alelo normal que codifica para Treonina. Sin embargo, puede forzarse la amplificación de la mezcla I sobre DNA normal ya sea aumentando la cantidad de copias de DNA humano o aumentando la concentración de primers en la mezcla de reacción. En este caso se aumentó la concentración de primers a 2x y 4x de lo señalado en el protocolo de la sección 5.4 de Materiales y Métodos cuyo valor es considerado 1x (0.5 μ M).

De acuerdo a los resultados de la sección 6.6, a concentraciones de mezcla I de primers 1x y 2x, la especificidad del método es alta ya que no hay amplificación en ninguna de las diluciones de Control Negativo en TE ya que la mezcla I es específica para la amplificación del Control Positivo. Sin embargo al aumentar la concentración de primers a 4x, se observan bandas de productos de amplificación hasta con 10 000 copias de Control Negativo.

Por su parte, la sensibilidad analítica se define como la cantidad más pequeña de una sustancia blanco que puede ser detectada por un método. La sensibilidad analítica del método descrito en el presente trabajo para la detección de la mutación T315I de ABL1 es de 0.03. Este dato indica que el límite de detección es de 300 copias de Control Positivo por cada 10000 de Control Negativo. Esta sensibilidad es buena si comparamos el resultado obtenido por Chen Q et al, (2007) al emplear ARMS-PCR tetra-primer para detectar la mutación V617F de JAK2, cuya sensibilidad es de 0.05 - 0.1. Resultados similares han sido reportados

por Gupta V et al., (2003) para detectar polimorfismos en TNF- α y Baig SM et al, (2005) para la identificación de mutaciones puntuales causantes de β -talasemia.

El resultado obtenido por el método del presente trabajo pone de manifiesto el potencial implícito para poder emplearlo en el diagnóstico clínico.

Como se comentó en la última sección de resultados, a una concentración 4x de primers la sensibilidad ocasionalmente puede alcanzar las 100 copias de Control Positivo por cada 10,000 copias de control negativo (0.01). Sin embargo a esta concentración de primers la posibilidad de formación de productos inespecíficos es alta, así como la formación de dímeros de primer. Si se quisiera alcanzar una sensibilidad analítica menor de 100 copias de Control Positivo a las concentraciones 1x ó 2x de primers sería necesario optimizar muy detalladamente todos los factores que afectan la PCR.

La concentración de primers ideal para este método es de 0.5 μ M a 1.0 μ M, ya que se obtienen buenos resultados con bandas regulares, fáciles de analizar e identificar. Por otra parte, se evita la posible formación de dímeros de primer que a mayor concentración podrían formarse, dando como resultado posibles bandas de menor intensidad o bandas de productos inespecíficos que dificulten la lectura de los resultados.

Debido a que los conceptos de especificidad y sensibilidad analíticas difieren en significado a los de especificidad y sensibilidad clínicas, será necesario determinar los valores de estos últimos parámetros para poder finalmente evaluar y determinar qué tan viable es este método en el diagnóstico clínico rutinario.

Finalmente, el plásmido pAULO-T315I obtenido en este método no sólo podría emplearse para identificar la mutación T315I de ABL1, sino que también podría emplearse como Control Positivo para la identificación de bcr-abl1 (CrPh).