**Nº 20**

**IMPLEMENTACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL TRANSCRIPTO BCR-ABL EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA**

**Sánchez, S1; Jolly, V1; Martínez de Nuñez, I2,3; Molas, C3, Quiroz, A3; Rodríguez, S1; Ayala-Lugo, A1** *email de contacto: anaayalalugo@gmail.com*

*1. Laboratorio de Genética. Departamento de Biología Molecular y Genética. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción. Asunción, Paraguay*

*2. Departamento de Hematología de la Segunda Cátedra de Clínica Médica. Hospital de Clínicas. FCM-UNA. Asunción, Paraguay.*

*3. Departamento de Hematología. Hospital Central Del Instituto de Previsión Social. Asunción, Paraguay.*

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o PCR en tiempo real (*real time PCR*) es el método de elección para la detección del transcripto BCR-ABL que es aceptado mundialmente para el monitoreo de la respuesta al tratamiento en pacientes con leucemia mieloide crónica que presentan una remisión citogenética completa. Esta técnica utiliza marcadores fluorescentes empleando sondas de ácidos nucleicos que se unen específicamente al gen de interés. La precisión de este método evita posibles secuencias inespecíficas, por lo que la interpretación de los resultados es rápida y directa. El objetivo del presente trabajo es describir la implementación de la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación del transcripto BCR-ABL en sangre periférica. Se utiliza el equipo de PCR en tiempo real ABI Prism 7500 (Applied Biosystems-EUA) y el kit MolecularMD One-Step qRT-PCR BCR-ABL (MolecularMD-EUA). Este método permite la cuantificación relativa de los niveles de expresión del transcripto BCR-ABL en comparación con un gen de referencia que está siendo expresado en forma constante, en este caso el gen ABL. Los resultados se expresan como una relación en % BCR-ABL/ABL pudiendo informarse los resultados en escala internacional (IS). Para la construcción de la curva estándar del transcripto BCR-ABL y del control ABL, se utilizan como calibradores plásmidos con valores que van de 3 hasta 300,000 copias para ambos. Para garantizar la exactitud del método se utilizan también 3 controles de ARN proveídos con el kit: a) un control con altos niveles del transcripto (10% BCR-ABL/ABL); b) un control equivalente a la respuesta molecular mayor (0,10% BCR-ABL/ABL) reportada en el estudio IRIS y c) un control negativo. Se presentan las curvas estándar de calibración de los plásmidos que contienen el gen BCR-ABL y el gen ABL, así como los valores de los RNA controles. La construcción de curvas de calibración para la implementación y estandarización de la cuantificación relativa del transcripto BCR-ABL es crítica para la determinación de sus niveles de expresión, debido a que refleja la cantidad de células leucémicas presentes en la muestra. Así, es posible el seguimiento de pacientes con remisión citogenética completa ya que la sensibilidad del PCR en tiempo real permite la detección de hasta 106 células leucémicas en circulación sanguínea.