



*Ministerio de Salud y Desarrollo
Social*

ANEXO VI

Línea de capacitación en Biología Molecular (aplicada al diagnóstico y seguimiento de las leucemias)

Fundamentación:

La correcta adecuación del tratamiento de los pacientes con leucemias, tanto agudas como crónicas, requiere, entre otros muchos factores pronósticos, el análisis de los rearrreglos moleculares que las definen dentro de distintos grupos de riesgo, de acuerdo a las características biológicas que los mismos confieren a la leucemia.

Por otro lado, en algunos casos la detección de determinados rearrreglos define la administración de terapias-blanco de los mismos, que actualmente se encuentran disponibles en nuestro país, como por ejemplo la indicación de inhibidores de tirosina quinasa en los portadores de leucemias positivas para el rearrreglo BCR-ABL. Finalmente, la detección de algunos de estos rearrreglos posibilita también el estudio de los mismos durante el tratamiento de los pacientes, y de esta forma, a través del llamado estudio de la enfermedad mínima residual, realizar adecuaciones del tratamiento de acuerdo a dichos resultados, antes de que la enfermedad se haga evidente en la observación por microscopía óptica.

El entrenamiento en la realización de este tipo de determinaciones es complejo y requiere de la adquisición de diversas destrezas en centros de referencia donde, además del personal idóneo, se cuente con un caudal de muestras que permita el estudio de numerosos casos, y además que ofrezca la posibilidad de participar de un sistema de estandarización de los métodos, con la finalidad de lograr luego reproducir estas técnicas localmente.

Actualmente en la mayor parte de las provincias de Argentina no se cuenta con la posibilidad de realizar este tipo de determinaciones en forma local o regional, por lo tanto, dichas muestras deben ser derivadas sistemáticamente a centros de esta capital. La derivación de las muestras implica el riesgo del deterioro, retraso o extravío de dicho material, sin contar además el esfuerzo que debe ponerse en la logística para



*Ministerio de Salud y Desarrollo
Social*

dicho envío y el gasto que el mismo genera. Esta problemática corresponde a la población de total de pacientes con Leucemia, tanto pediátricos como adultos.

Existen laboratorios a nivel público en algunas provincias de nuestro país que cuentan con el equipamiento necesario para desarrollar estas determinaciones y la incorporación de un profesional formado en los métodos de biología molecular para el diagnóstico y seguimiento de las leucemias hará posible la puesta a punto y realización de dichos estudios, con clara importancia asistencial.

Por otro lado, la puesta a punto de esta metodología en centros de la esfera pública permitirá que estas determinaciones puedan realizarse para pacientes con cobertura social, generando para el centro público beneficiado un recurso de autogestión para el abastecimiento de reactivos, mantenimiento de los equipamientos, etc.

El desarrollo de estas determinaciones también beneficiará a los pacientes adultos con este tipo de patologías y -generando los convenios pertinentes- podrá ser extensivo a otras provincias, convirtiendo al laboratorio que incorpore el personal formado en centro de referencia regional.

Finalmente, el profesional formado en el Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología y Oncología del Hospital Garrahan podrá luego mantener una fluida comunicación con el mismo, facilitando el posterior intercambio de conocimientos y la discusión, tanto de la puesta a punto de las técnicas, como de los casos complejos que requieran de un análisis común, participación en controles de calidad, estandarización de nuevas técnicas, etc.

Objetivos

General:

-Formar profesionales en los métodos de biología molecular para el diagnóstico y seguimiento de las leucemias.

Específicos:

-Contribuir a desarrollar centros de referencia regional.



*Ministerio de Salud y Desarrollo
Social*

-Desarrollar redes de intercambio para actualización y estandarización de nuevas técnicas y procedimientos.

Requisitos para postular a la beca:

- Bioquímico/a, Biotecnólogo/a o Biólogo/a con título expedido por Universidad Nacional o Privada reconocida oficialmente para el ejercicio de la profesión, otorgado por autoridad nacional competente.
- Hasta 10 años de recibido.
- Debe contar con el aval del centro en el cual aplicará luego las destrezas adquiridas.
- El becario deberá además comprometerse a regresar a su lugar de origen, para poner a punto las técnicas aprendidas y desarrollarlas, por un período de al menos tres años.

Contenidos:

Plan de Formación:

El programa de formación incluirá en todos los casos el estudio de los aspectos teóricos de cada tema y el entrenamiento necesario para que el becario adquiera las destrezas prácticas que le permitan reproducir las técnicas moleculares.

Los períodos estimados para cada unidad han sido definidos considerando que las distintas actividades se realizarán en muchos casos en forma simultánea.

Unidad 1

Introducción a la metodología de trabajo en un laboratorio de biología molecular. Normas de calidad y de Bioseguridad. Distribución de las zonas pre-PCR y post-PCR. Fundamentos y preparación de geles de agarosa y de geles de poliacrilamida. Aplicaciones de cada uno de ellos.



*Ministerio de Salud y Desarrollo
Social*

Unidad 2

Procesamiento de muestras de diagnóstico y seguimiento.

Condiciones de las diferentes muestras de acuerdo con el diagnóstico presuntivo y las determinaciones que se realizarán. Gradiente de Densidad para separación de células mononucleares. Purificación de Leucocitos Totales. Extracción de ARN. Extracción de ADN. Cuantificación de ácidos nucleicos. Verificación de integridad. Concepto y determinación de Gen control.

Unidad 3

Reacción de PCR. Variables que influyen en la puesta a punto de las reacciones. Prevención de contaminación. Controles.

RT-PCR. Reacción de Transcripción Reversa *in vitro* (RT). Estudio del algoritmo de determinaciones a realizar de acuerdo al tipo de leucemia. Correlación con otros métodos diagnósticos: citoquímica, estudios de inmunofenotipo.

Unidad 4

Fundamentos teóricos de q-RT-PCR (RT-PCR cuantitativa en tiempo real). Cinética enzimática. Fundamentos matemáticos de la misma. Estudio de los pasos necesarios para la puesta a punto de esta técnica. Análisis de su aplicabilidad. Evaluación de casos prácticos orientada a la capacidad de interpretación de los resultados.

Unidad 5

Fundamentos de Detección de rearrreglos de Ig/TR por técnicas de PCR. Puesta a punto de reacciones de PCR de tipo multiplex. Estructura de los genes de los receptores: Inmunoglobulinas y Receptores de linfocitos T. Análisis de heterodúplex para la detección de clonalidad. Reacción de Secuenciación de los rearrreglos



*Ministerio de Salud y Desarrollo
Social*

obtenidos. Interpretación de las mismas. Utilización de bases de datos automatizadas para la caracterización de los segmentos involucrados en los distintos rearreglos.

Unidad 6

Aprendizaje del uso de herramientas informáticas aplicadas a las técnicas de biología molecular. Secuencias de referencia. Detección de SNPs. Herramientas para el diseño de *primers*. Criterios, fundamentos. Análisis de fragmentos.

Unidad 7

Fundamentos de la Determinación de Enfermedad Mínima Residual por q-PCR utilizando como blanco los rearreglos de Ig/TR. Estudio de los pasos necesarios para la puesta a punto de esta técnica. Construcción de curvas estándar para cada paciente. Diseño de *primers* paciente-específicos. Análisis de su aplicabilidad. Evaluación de casos prácticos orientada a la capacidad de interpretación de los resultados. Interpretación de los resultados de EMR.

Unidad 8

Fundamentos de la técnica MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*). Interpretación de resultados del análisis de la alteración de número de copias (ANC) de diversos genes: *IKZF1*, *CDKN2A/B*, etc.

Estudio de otras mutaciones asociadas a leucemias agudas: *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *GATA*, etc. Puesta a punto y análisis del valor pronóstico de las mismas.

Unidad 9

Fundamento de PCR digital. Puesta a punto. Estudios de Enfermedad Mínima Residual utilizando como blanco los rearreglos Ig/TR y el transcriptos de fusión *BCR-ABL1*. Interpretación de resultados. Correlación con resultados por q-PCR.



*Ministerio de Salud y Desarrollo
Social*

Metodología

Prácticas en el laboratorio, incluyéndose en las tareas cotidianas del mismo.

Preparación de ateneos.

Preparación de Seminarios Bibliográficos.

Participación en los Ateneos del Servicio de Hematología-Oncología.

Carga horaria:

La beca tiene una duración anual con carga horaria total de 1.800 horas anuales.

Incluye la actividad asistencial, docente y de investigación.

La beca de capacitación será de lunes a viernes y no contempla la realización de guardias.

Evaluación

-Evaluación periódica de los conocimientos teóricos.

-Evaluación continua de la adquisición de destrezas prácticas.

-Deberá asistir al 95% de las actividades teóricas y prácticas.

Sede:

Laboratorio de Diagnóstico Molecular del Servicio de Hematología y Oncología del Hospital de Pediatría Garrahan. Combate de los Pozos 1881, Capital Federal, Buenos Aires, Argentina.