

INFORME DE PASANTÍA

LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ORIENTACIÓN BIOLOGÍA CELULAR

“Algunos análisis característicos y Determinación de la Prevalencia de la Mutación de Leiden (FVQ 506) en el Factor V de la Coagulación en la Población Uruguaya”

Marie-Noël Bruné

Tutora: Prof. Dra. Cristina Arruti

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo tuvo lugar en el Laboratorio Genia (Canelones 2291) bajo la supervisión del Dr. Carlos Azambuja y en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias bajo la supervisión del Dr. Carlos Sanguinetti. El trabajo estuvo coordinado por la Prof. Dra. Cristina Arruti del Departamento de Biología Celular de Facultad de Ciencias.

A todos ellos muchas gracias por el constante apoyo, paciencia y enseñanza.

Se agradece la colaboración del Dr. Juan Carlos Cazerres y del Téc. Lab. Humberto Lima del CASMU, junto a quienes fueron publicados los resultados, así como de la Prof. Adj. Dra. Daniela Lens del Departamento Básico de Medicina del Hospital de Clínicas por sus aportes.

ÍNDICE

SECCIÓN I: Desarrollo de un sistema específico de rutina

Objetivo	Pág. 6
Introducción	Pág. 6
Hemostasia y Mutación de Leiden	
Riesgo de trombosis	
Tratamiento	
Examen y su importancia en Uruguay	
Materiales y Métodos	Pág. 13
Muestras de sangre	
Extracción de ADN	
Cuantificación	
Amplificación por PCR	
Electroforesis	
Enzimas de restricción	
Resultados	Pág. 19
Discusión	Pág. 21
SECCIÓN II: ESTUDIO DE UN CASO ESPECÍFICO	
Determinación del status de la mutación de Leiden en tres generaciones de una familia	Pág. 23
Importancia del conocimiento de la resistencia a la proteína C activada para el paciente y su familia	Pág. 25
Riesgo para la familia	Pág. 25
Publicación de los resultados	Pág. 26
BIBLIOGRAFÍA	Pág. 27

APÉNDICE I: PROTOCOLOS DE TRABAJO PARA DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN DE LEIDEN (FVQ 506)

Protocolos de extracción de ADN	Pág. 29
Protocolo de extracción de ADN de PROMEGA “Wizard DNA Purification System” a partir de sangre (300 l)	
Protocolo de Extracción de ADN según Kawasaki a partir de pellet nuclear.	
Protocolo de Extracción de ADN de InstaGene a partir de sangre	
Protocolos de preparación de soluciones de amplificación y digestión para factor V de Leiden	Pág. 31
Solución de amplificación de Leiden	
Solución de digestión 5 X	
Protocolos de preparación de geles para electroforesis	Pág. 32
Preparación de gel de agarosa	
Gel de poliacrilamida SDS PAGE	
Protocolo de tinción de geles de electroforesis	Pág. 33
Protocolo de tinción de plata según Carlos Sanguinetti	
APÉNDICE II: REGLAS BÁSICAS DE TRABAJO EN LABORATORIO Y TÉCNICAS GENERALES DE UN LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR	
Generalidades	Pág. 34
Bioseguridad	Pág. 34
Previnendo accidentes de trabajo	Pág. 35
Generalidades	
Causas que aumentan la probabilidad de accidentes	
Para descartar el material contaminado	
Para descontaminar soluciones de bromuro de etidio	
Antes de irse	
Ante un accidente de laboratorio	Pág. 38
Si se trata de un accidente con instrumento punzante	
Si se trata de un accidente biológico	
Muestras – Medidas de seguridad	Pág. 39

Descripción de la actividad del laboratorio

Riesgos

Organización del laboratorio en áreas de trabajo

Técnicas generales

OBJETIVOS GENERALES

Este trabajo estará dividido en dos secciones y dos apéndices que comprenden los objetivos de la pasantía:

I) Sección I

Por una parte, la **familiarización con un número de técnicas y metodologías de genética molecular.**

Estas técnicas son utilizadas rutinariamente en un laboratorio de biotecnología orientado a la prestación de servicios.

Nos concentraremos en el estudio diagnóstico de una mutación en particular: la mutación de Leiden (FVQ 506).

Para ello desarrollaremos un **sistema de diagnóstico específico de rutina**, para esta mutación (puntual).

Para ello requerí entrenamiento en:

- Almacenamiento de muestras de sangre
- Extracción de ADN y comparación de distintos métodos de extracción
- Cuantificación de ADN
- Amplificación por PCR
- Electroforesis
- Digestión con enzimas de restricción

Analizaremos la prevalencia de esta mutación en un subgrupo poblacional uruguayo.

II) Sección II

Estudiaremos como caso ilustrativo un caso particular de una familia con la mutación estudiada.

III) Apéndices I y II

Protocolos aprendidos durante la pasantía y usados en el sistema diagnóstico específico desarrollado en la sección I:

- Extracción de ADN
- Preparación de soluciones de amplificación
- Preparación de soluciones de digestión
- Preparación de geles para electroforesis
- Tinción de geles de electroforesis

Aprendizaje de las reglas básicas para el trabajo en un laboratorio y técnicas generales de biología molecular:

- Generalidades y bioseguridad de trabajo en laboratorio

- Prevención de accidentes de trabajo
- Ante un accidente de laboratorio
- Muestras – Medidas de seguridad
- Caso de un laboratorio de biología molecular: GENIA

SECCIÓN I: DESARROLLO DE UN SISTEMA ESPECÍFICO DE RUTINA: Análisis de la mutación FV Q506 (LEIDEN) del gen que codifica para factor V de la coagulación humana

OBJETIVO

Nuestra intención es establecer la prevalencia de la mutación de Leiden (FVQ 506) en el factor V de la coagulación en la población uruguaya ya que no existen datos al respecto, aún cuando se trata de una alteración genética que aumenta significativamente el riesgo de trombosis venosa y que, debido a nuestras características étnicas, esta prevalencia tiene muchas probabilidades de ser alta. Por otra parte, como ya explicaremos, esto ayudaría en la evaluación de programas de screening para identificar los individuos portadores de la mutación y ofrecerles terapia profiláctica.

INTRODUCCIÓN

La biología molecular aplicada a la medicina está teniendo un gran desarrollo. Un claro ejemplo de esto es el gran desarrollo del Proyecto Genoma Humano. Presenta la ventaja de que es independiente de reactivos específicos. Sólo se necesita información para poner a punto los métodos. Entre ellos, la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) presenta la ventaja que puede aclarar una gran cantidad de temas, investigar distintas alteraciones o mutaciones siguiendo siempre la misma rutina.

En los métodos de diagnósticos basados en PCR, se siguen estos pasos:.

- 1) Identificación de un problema relevante
- 2) Búsqueda bibliográfica sobre el tema.
- 3) Selección de mecanismo más adecuado según el país y el laboratorio en que se aplica. Debemos tener en cuenta para ello cuáles son las condiciones y los aparatos necesarios y más adecuados
- 4) Síntesis de los oligómeros (para PCR)
- 5) Aplicación de la técnica.

Hemostasia y Mutación de Leiden

Hemostasia

La hemostasia es el proceso que mantiene la integridad del árbol vascular y evita y corrige posibles obstrucciones.

La hemostasia puede subdividirse en fases en las que hay interacción entre la pared de los vasos y la sangre:

- 1) Vasoconstricción del área afectada
- 2) Formación de un trombo de plaquetas sobre la superficie vascular lesionada
- 3) Formación de fibrina que refuerza dicho trombo
- 4) Eliminación de los depósitos de fibrina: fibrinólisis.

Nos concentraremos en la formación de fibras de fibrina, o **coagulación plasmática**, que transforma el fibrinógeno (soluble) en una proteína insoluble gracias a la trombina (enzima proteolítica formada gracias a la activación de la protrombina).

La protrombina y el fibrinógeno, junto a otros elementos son los factores de la coagulación necesarios para que se forme fibrina. Estos elementos son principalmente proteínas que se dividen en tres grupos:

- factores dependientes de la vitamina K
- factores sensibles a la trombina: fibrinógenos y factores V, VIII y XIII. Formados por moléculas de alto PM. No se encuentran en el suero ya que son consumidos en el momento de la coagulación.
- factores de contacto

La **coagulación sanguínea** es el producto de una cascada de reacciones en las que una proenzima inactiva es convertida en enzima activa, la que a su vez activa otra proenzima. Este proceso tiene 2 etapas:

- conversión de protrombina en trombina La conversión de protrombina en trombina por el factor X activado requiere fosfolípidos, calcio y el factor V.
- conversión del fibrinógeno en fibrina gracias la trombina formada.

Existen **dos tipos de inhibidores de la coagulación sanguínea**: los inhibidores de las serina-proteasas y los inhibidores de los factores V y VIII activados: proteína C (PC) y proteína S (PS).

La PC, sintetizada originalmente como una sola cadena, se transforma en dos cadenas por proteólisis. Para tener actividad anticoagulante, la PC debe ser activada por la trombina. La PC activada destruye proteolíticamente las actividades coagulantes de los factores V y VIII activados (degrada la cadena pesada de ambos). La actividad de la PC activada es inhibida por una enzima con la que forma un complejo. La heparina acelera 30m veces la inactivación de la proteína C por este inhibidor.

La proteína S es una glucoproteína que funciona como cofactor en la inactivación de los factores V y VIII activados por la proteína C (17).

Mutación de Leiden

Las propiedades hemodinámicas de la sangre se deben a un equilibrio natural entre factores que tienden a promover la coagulación y otros que tienden a controlarla. Esto ocurre entre el factor V de la coagulación y su antagonista, la proteína C activada. La forma activada de la proteína C plasmática regula negativamente la formación de trombina por medio de la proteólisis limitada del Factor V activado.

El factor V es un heterodímero proteico cofactor del complejo de activación de la protrombina. Consiste en una cadena pesada y una liviana.

La proteína C activada (APC) es una proteasa sérica con propiedades anticoagulantes importantes que se forma en la sangre en el endotelio a partir de un precursor inactivo. Durante la hemostasis normal, la APC limita la formación de coágulos por la inactivación proteolítica de los factores Va y VIIIa. Para realizar esto eficientemente, la enzima necesita un cofactor no enzimático, la proteína S. Recientemente se encontró que la respuesta anticoagulante a la APC (resistencia a APC) se encuentra en el 5% de los individuos sanos, lo que provoca que en estos individuos aumente siete veces el riesgo de trombosis venosa (5). La resistencia a la APC (Proteína C Activada) es la predisposición más común para la trombosis venosa.

En 1994, Bertina y col. (5) averiguaron que lo que causaba la mayor parte de esta resistencia a la APC era la mutación puntual del factor V que causa que la arginina (Arg506) sea reemplazada por la glutamina (Gln506) en el sitio de clivaje del APC, lo que no permite una degradación efectiva por parte del APC del factor V Gln506 activado y mutado. La resistencia a la proteína C es causada por una sustitución CGA --> CAA en la posición 1691 del gen del factor V de Leiden que bloquea la unión de la proteína C activada al factor protrombótico V, produciendo trombofilia. Se trata de una herencia dominante autosómica (1). La variante mutada del factor V (FV Q⁵⁰⁶) se denominó factor V Leiden en homenaje a la universidad donde Bertina realizó sus investigaciones.

Por lo tanto, la mutación de Leiden (factor V de Leiden) es la causa genética más común en las trombosis venosas (20 – 40% de los casos) (2). Está involucrada en un 20-40% de los casos y está presente en un 3% de la población en general. Esto es muy importante si se tiene en cuenta que 1 en 1000 personas por año, o sea 3000 personas por año en Uruguay sufren de trombosis venosa sintomática (3).

Hay tres anticoagulantes fisiológicos que interactúan con distintos componentes de la cascada de coagulación:

- proteína C
- proteína S
- antitrombina III

Otras causas genéticas de anomalías heredadas en estos tres anticoagulantes biológicos que tienen un rol en las trombosis venosas pueden ser:

- Deficiencia de proteína C
- Deficiencia de proteína S
- Deficiencia de antitrombina III
- Factor II G20210A (alteración en el gen de la protrombina)

Sin embargo, estas causas suman sólo el 5 – 10 % de los casos de trombosis venosas genéticas (3)

Los mayores riesgos de trombosis se dan cuando algunas de estas causas genéticas se encuentran asociadas. También hay circunstancias que pueden hacer aumentar el riesgo de trombosis si nos encontramos ante individuos con la mutación que tratamos. Debemos tener en cuenta que la presencia de la mutación del factor V aumenta el riesgo de trombosis venosas 7 veces en heterocigotas y 80 veces en homocigotas (3).

Riesgo de trombosis

Hay varios factores predisponentes que asociados a la mutación de Leiden aumentan el riesgo de trombosis venosas (9). En especial si están combinados entre sí y/o con las demás causas genéticas enumeradas arriba:

- El uso de **anticonceptivos orales** (aumenta la probabilidad 35 veces en heterocigotos y 90 en homocigotos).
- La **terapia de reemplazo hormonal** (estrógenos) utilizada por mujeres climatéricas.
- **Embarazo**. La mutación del factor V de Leiden se ha encontrado frecuentemente en pacientes con placenta abrupta (8). Se recomienda tratamiento con heparina durante el embarazo. (60% de las pacientes que desarrollan trombosis en el embarazo o período postparto tiene la mutación del factor V.)
- **Obesidad**
- **Tabaquismo**
- **Diabetes Mellitus**
- **Afecciones malignas**
- **Inmovilidad**
- **Post-operatorio**
- **Trauma**
- **Lupus**
- **Edad**: Debido a que la trombosis aumenta junto con la edad, el riesgo es más pronunciado en pacientes mayores. Para los individuos homocigotos este riesgo aumenta a nivel de varios puntos porcentuales por año. Esto implica que la mayoría de los individuos homocigotos para el factor V Leiden sufrirán por lo menos un evento trombótico en su vida (4). Para los heterocigotas, esta probabilidad es del orden del 10%.

La presencia del alelo del factor V Leiden, sin embargo, no se considera un riesgo mayor para los trombosis arteriales e infarto miocárdico (9).

Es conveniente estudiar a todas aquellas personas con historia personal o familiar de que hayan tenido trombosis venosa, trombolismo pulmonar, flebitis reiteradas o enfermedad vascular periférica, en especial previamente a embarazo, cirugía mayor, tratamientos hormonales. También es importante el estudio si a esa persona se le ha detectado previamente resistencia a proteína C o si un familiar presenta mutación de Leiden.

Es importante conocer si una persona tiene esta mutación para poder establecer una etiología para la trombosis de este individuo, identificar familiares con peligro de trombosis, prevenir futuras trombosis (evitando los factores circunstanciales enumerados arriba).

Tratamiento

El tratamiento de pacientes con trombofilia de factor V de Leiden depende de las circunstancias clínicas. La primera trombosis aguda generalmente se trata rutinariamente con heparina sin fraccionar IV o heparina de bajo peso molecular subcutánea. Seguida por warfarina administrada por vía oral por tres a seis meses. El tratamiento anticoagulante oral a largo plazo debe ser considerado en pacientes con tromboembolismo recurrente, anormalidades hemostáticas múltiples u otros riesgos circunstanciales u hormonales en pacientes homocigotos para la mutación. Se recomienda eliminar los factores de riesgo circunstanciales.

En ausencia de historia de trombosis, la anti-coagulación a largo plazo no se recomienda rutinariamente para individuos asintomáticos heterocigotos. La anticoagulación profiláctica debe aplicarse en momentos de alto riesgo como el embarazo, cirugías o inmovilización prolongada.

Las decisiones en cuanto a profilaxis y anticoagulación a largo plazo deben ser basadas en un asesoramiento riesgo/beneficio a ser considerado para cada caso individual.

Examen y su importancia en Uruguay

Bertina et al. (5) reportaron un ensayo basado en PCR para la detección de la sustitución de una G a una A en nt 1691. Este ensayo está basado en la pérdida de un sitio de restricción MnlI en el producto de PCR si la mutación está presente.

El descubrimiento de la mutación del factor V en 1994 ha revolucionado el manejo diagnóstico de pacientes con hipercoagulabilidad, y la capacidad de detectar esta mutación en parientes asintomáticos ofrece la oportunidad de prevenir trombosis venosa mediante el manejo especial de aquellos individuos en riesgo.

Según V. De Stefano (1998) (6), esta mutación se encuentra en aproximadamente 5% de los individuos caucásicos (europeos, judíos, árabes israelíes e indios) y está ausente en africanos y asiáticos (hay una baja prevalencia de la mutación en afro-americanos debido a recientes mezclas raciales), lo que sugiere un origen único de la mutación y ha sido probado por análisis de haplotipos. Además, según J.P. Gregg (1997) (7), en una prueba multiétnica de 602 individuos, los hispano-americanos tuvieron la frecuencia más alta (1.65 %) del alelo mutado del factor V de Leiden (descartando a los caucásicos europeos y americanos), seguidos por los afro-americanos (0.87 %). Según estos datos, y además debido al origen europeo de la población uruguaya, es muy probable que haya una gran prevalencia de esta mutación en los individuos de nuestro país, lo que debe ser investigado.

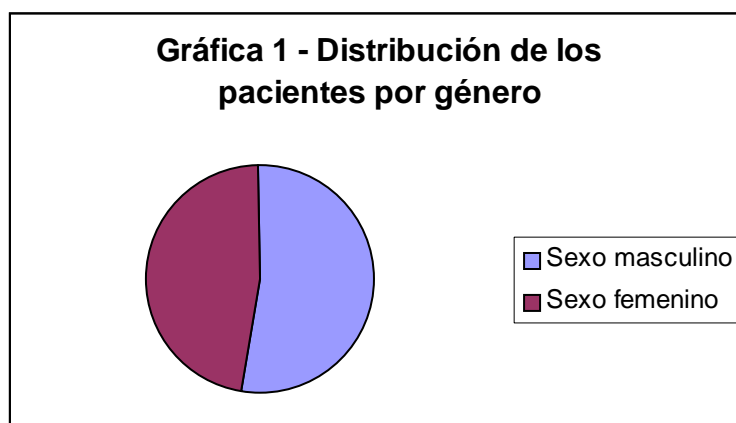
Finalmente, la estratificación étnica de la prevalencia de la mutación hace necesario un estudio local que serviría de base para la evaluación de la relación costo-beneficio de programas de screening (para identificar individuos con riesgos tromboembólicos) en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de sangre

Se trabajó con 188 muestras de sangre de donantes voluntarios de raza caucásica de Montevideo. La sangre fue extraída con jeringa de plástico. Las edades variaron de 16 a 64 años y 47.7% fueron del sexo femenino y 52.3% del sexo masculino.

Ver gráfica 1



Estas muestras fueron aleatorias, es decir no se sabía nada sobre su predisposición a la trombofilia o hacia la mutación de Leiden.

Se mezcló 4 cc. de sangre venosa en un tubo con sal tripotásica de ácido etilen di amino tetra acético (anticoagulante). El ADN se extrajo de 2 a 4 meses después de obtenida la sangre. La sangre fue conservada a 4°C hasta ese entonces.

Se utilizaron sólo 300 µl de sangre, guardando el resto para otros posibles estudios.

Extracción de ADN

Se utilizaron las muestras tipo de factor V de Leiden mutado. Se confirmó que poseían la mutación de Leiden por la digestión con Mnl de ADN amplificado según Corral en 1996 (11) y se usaron como control positivo en nuestros experimentos.

Debido a la cantidad de muestras a analizar, decidimos elegir entre los métodos disponibles de extracción de ADN el que resultara más confiable y sencillo para realizar el estudio. Comparamos el rendimiento de distintos métodos de extracción.

Los métodos a comparar fueron:

- Extracción según kit de PROMEGA (Ver apéndice)
- Extracción según kit de InstaGene (Ver apéndice)
- Extracción por método de Kawasaki (Ver apéndice)

Los parámetros a considerar fueron:

- 1) **Tiempo de extracción** – Ver protocolos

- 2) **Eliminación de inhibidores** – Lo medimos a nivel de la eficiencia de amplificación ya que los métodos por InstaGene y Kawasaki no pueden ser cuantificados.
- 3) **Susceptibilidad al almacenamiento a - 20 °C**
- 4) **Precio**

Se encontró lo siguiente:

- 1) **Tiempo de extracción**
El protocolo de extracción más rápido de los tres resultó ser el de InstaGene (lleva aprox. 80 minutos), que sería unos 20 minutos más rápido aproximadamente que los otros dos (llevan aprox. 100 minutos).
- 2) **Eliminación de inhibidores**
Se midió por rendimiento de amplificación. Amplificamos tres series de 10 muestras con los tres métodos y vimos que por el método de InstaGene, de 10 muestras amplificaron sólo 3 y por el método de Kawasaki de 10 muestras amplificaron 4. Siguiendo el protocolo de PROMEGA amplificaron 9 de las 10 muestras.
- 3) **Susceptibilidad al almacenamiento**
Amplificamos el ADN extraído por los distintos métodos antes y después de ser almacenado un mes a -20 °C. Sólo amplificó el ADN extraído por PROMEGA.
- 4) **Precio**
Si tomamos en cuenta el costo de la extracción, el método de Kawasaki es el más barato de los tres y el de PROMEGA el más caro.

Como hemos visto, los protocolos de extracción de ADN más económicos son los de InstaGene (que además es el más rápido) y de Kawasaki. Sin embargo, estos no nos dieron buenos resultados y como contamos con muchas muestras para analizar, decidimos seguir el protocolo de PROMEGA que resultó ser el más adecuado para llevar a cabo este estudio.

Por lo tanto, se extrajo el ADN a partir de la sangre según protocolo de PROMEGA “Wizard DNA Purification System” (ver apéndice).

Cuantificación

Se cuantificó el ADN mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%(Ver apéndice), usando 5 μ l de muestra y 2 μ l de buffer de cargada azul. Se utiliza TBE 10X.

Se realiza valoración con transiluminador de luz ultravioleta y registro mediante fotografía polaroid comparando el brillo de la banda de la muestra problema con el brillo de cantidades conocidas de λ (100 ng/ μ l, 50 ng/ μ l, 25 ng/ μ l, 12 ng/ μ l).

Nota: Tanto el método de extracción de ADN por InstaGene como el de Kawasaki no se puede cuantificar porque el proceso de purificación incluye desnaturalización.

Amplificación por PCR

Una vez cuantificado el ADN, se comienza la amplificación por PCR (según protocolo de J. Corral en 1996 (11)) del exón X (es el que contiene el nucleótido en la posición 1691 del gen del factor V que es el que puede estar mutado).

Agregamos 23 μ l de solución de amplificación de Leiden (Ver apéndice) a 2 μ l (20 ng) de ADN y se ponen los tubos en un termociclador Perkin Elmer 2.400 cuando la placa alcanzó los 94 °C (HOT START: Este principio consiste en evitar las extensiones espúreas o no específicas mediante el inicio del proceso de PCR a temperaturas superiores a las de síntesis de ADN a partir de la Taq polimerasa.)

Condiciones de amplificación:

- A nivel de preparación de oligonucleótidos. Se utilizaron como iniciadores:

FVf: (5´ - ACC CAC AgA AAA TgA TgC CCA g – 3´) - 0.25 μ M

FVr: (5´ - TgC CCC ATT ATT Tag CCA ggA g-3´) - 0.25 μ M

- Concentración de magnesio: 1.5 mM
- Se agrega buffer de PROMEGA que contiene KCl y Tris-HCl para obtener el pH adecuado de 8.5.
- Temperaturas y tiempos de los ciclos de amplificación: 30 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 53°C (hibridación) y 30 segundos a 72°C (extensión).
- Uso del termociclador: Recibí entrenamiento en crear nuevos ciclos y almacenarlos.

Electroforesis

Los productos amplificados (5 μ l) se sometieron a electroforesis a 5 V/cm durante 30 minutos en gel de agarosa al 2 % conteniendo 1.5 μ g/ml de bromuro de etidio.

Finalmente se visualizan los productos amplificados con transiluminador de luz ultravioleta. Se verifica que el fragmento de ADN amplificado coincide con el esperado de 223 pares de bases. Se utiliza como escalera la digestión del bacteriófago Phy 147 con la enzima Hinf. I (PROMEGA).

Enzimas de restricción

Preparamos solución de digestión a concentración 5 X (ver apéndice), digerimos el ADN amplificado (5 μ l de solución de digestión y 20 μ l de ADN) e incubamos a 37°C toda la noche.

Se corre esta solución en un gel de poliacrilamida al 10% de 12 x 8 cm a 250 volts por 60 minutos (ver preparación de geles PAGE en apéndice).

Se tiñe con nitrato de plata según protocolo de Carlos Sanguinetti (10) (ver apéndice).

Otra alternativa fue teñir los geles con bromuro de etidio en la misma concentración en que se encontraba éste en el gel por 30 minutos y miramos con transiluminador ultravioleta. Se prefirió la tinción con nitrato de plata ya que permite un registro permanente.

Se registran las imágenes con cámara digital y se realiza un mapa de restricción de los fragmentos amplificados. Se hace el cálculo de los pesos moleculares de las distintas bandas observadas utilizando marcador de referencia. Cada carril del gel corresponde a un individuo diferente. Se ven los fragmentos de ADN como bandas al ser teñidos y estar ordenados por su peso molecular.

Los 223 pb del fragmento amplificado del gen de factor V se dividen en:

- Siempre se observa una banda de 37 pb que es producto de la digestión del gen normal.
- Siempre se observa una banda de 82 pb (control de digestión)
- Una banda de 104 pb corresponde al fragmento del gen normal
- Una banda de 141 pb que corresponde al fragmento del gen mutado

Ver figura 1.

Un individuo normal presenta dos copias de su gen de factor V normales (copia materna y paterna), por lo que se observan tres bandas de 104 pb, 82 pb y 37 pb.

Finalmente un individuo homocigota mutado (FV:Q506) presenta las dos copias (materna y paterna) de su gen de factor V mutadas, por lo que se observan bandas de 141 pb y 82 pb. La banda de 141 pb corresponde a las de 104 y 37 que presenta el individuo no mutado juntas, ya que la enzima de restricción Mnl no reconoce el sitio con la mutación y no corta al gen de 223 pb en dos sitios, como al gen normal, sino que en uno.

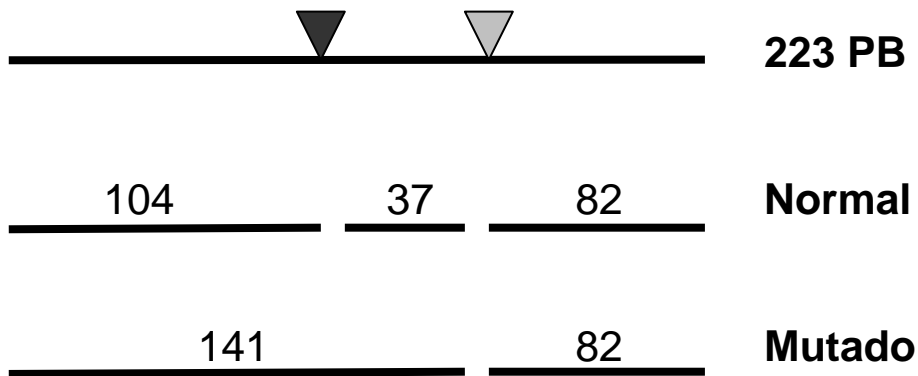
Un individuo heterocigota presenta una copia normal y una copia mutada de su gen de factor V por lo que se observan cuatro bandas distintas en el patrón: 141 pb, 104 pb, 82 pb y 37 pb.

Ver figura 2.

En la figura 3 vemos un lote de muestras digeridas en las que vemos las distintas bandas de distintos pesos moleculares que se observan y explican con detalle en la figura 2. Vemos en la figura 3 una muestra de un individuo heterocigota, con el fragmento de 141 pb, entre varias muestras de individuos normales.

Es de destacar que, para mayor seguridad, se realizaron controles de amplificación y de digestión utilizando muestras tipo que ya sabíamos poseían la mutación.

Figura 1: Mapa de restricción del fragmento amplificado del factor V

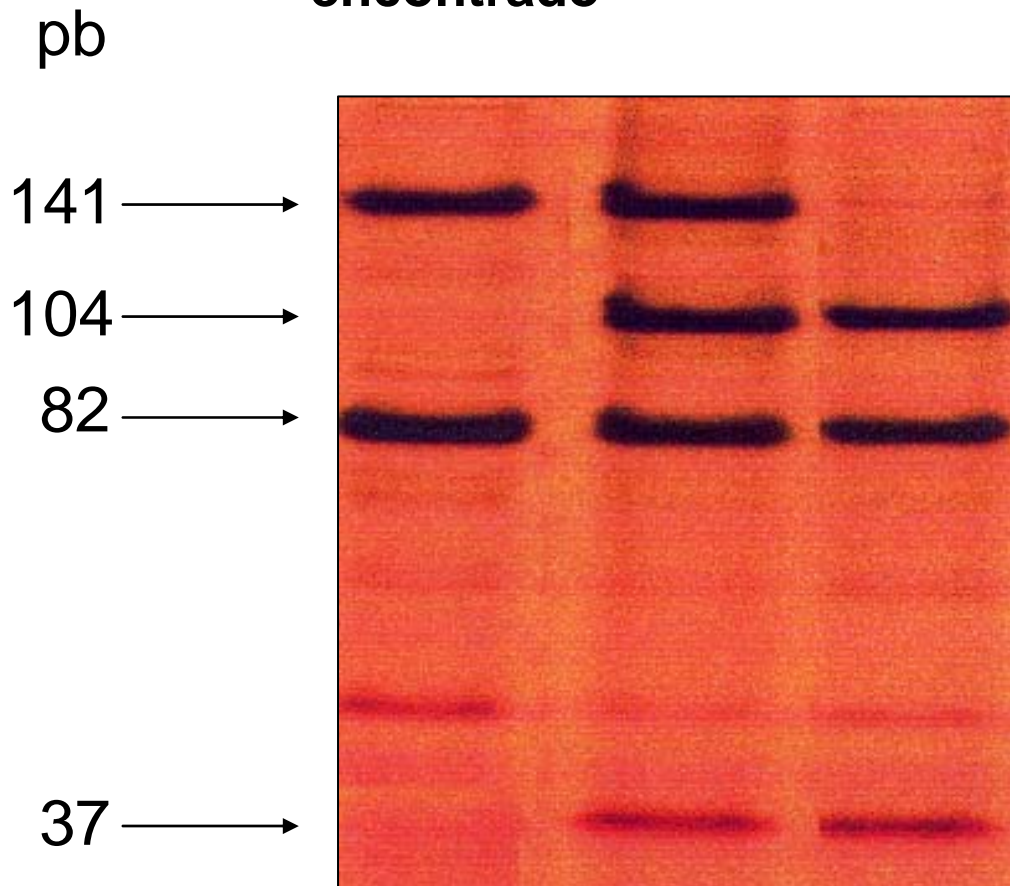


▼ Sitio MNI I variable

▼ Sitio Mnl I constante

- La banda de 141 pares de bases corresponde al fragmento del gen de factor V mutado
- La banda de 104 pares de bases corresponde al fragmento del gen de factor V normal
- La banda de 82 pares de bases está presente en todos los individuos y es utilizada como control de digestión.
- La banda de 37 pares de bases es un producto de digestión del gen normal.

Figura 2 – Resultados según genotipo encontrado



- 1- Individuo homocigota mutado
- 2- Individuo heterocigota mutado
- 3- Individuo homocigota normal

La banda superior de ADN (141 pb) corresponde a la copia del gen de factor V mutada y la inferior (104 pb) a la copia normal.

- Carril 1** – Individuo homocigoto mutado con las dos copias de su gen de factor V mutadas.
- Carril 2** – Perfil de un individuo heterocigota con una copia normal y una copia mutada
- Carril 3** – Perfil de un individuo normal con las dos copias de su gen de factor V normales

RESULTADOS

Analizamos 188 muestras de sangre. La prevalencia de la mutación fue del 4.79%. Se encontraron 8 individuos heterocigotos (4.26%) y 1 homocigoto (0.53%) para la mutación de Leiden. Estas proporciones de individuos homocigotos y heterocigotos corresponden a una población en equilibrio de Hardy-Weinberg: $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1.0$. No se destacaron sesgos en los sexos (se trata de una mutación en un autosoma) ni en las edades.

Frecuencia génica

Contamos "cromosomas", alelos observados

$$N^{\circ} \text{ total: } 188 \times 2 = 376$$

$$N^{\circ} \text{ copias mutadas} = (8 \times 1) + (1 \times 2) = 10$$

$$N^{\circ} \text{ normales} = (179 \times 2) + (8 \times 1) = 366$$

Calculamos p (frecuencia génica del alelo normal)

$$376 - 100 \%$$

$$366 - p$$

$$p = (100 \times 366) / 376 = 0.973$$

Calculamos q (frecuencia génica del alelo mutado)

$$376 - 100 \%$$

$$10 - p$$

$$q = (100 \times 10) / 376 = 0.0265$$

Frecuencia genotípica esperada

$$AA = p^2 = 0.946$$

$$Aa = 2 pq = 0.051$$

$$aa = q^2 = 0.001$$

Frecuencia genotípica observada

$$AA = 0.952$$

$$Aa = 0.042$$

$$aa = 0.005$$

Individuos observados:

$$AA = 179$$

$$Aa = 8$$

$$aa = 1$$

Individuos esperados:

$$AA = p^2 n = 0.973^2 \times 188 = 178$$

$$Aa = 2 pq n = 2 \times 0.973 \times 0.0265 \times 188 = 9.7$$

$$aa = q^2 n = 0.0265^2 \times 188 = 0.13$$

Calculamos χ^2

$$\begin{aligned}\Sigma \chi^2 &= \Sigma [(Obs - Esp)^2 / Esp] = \\ &[(179-178)^2 / 178] + [(8 - 9.7)^2 / 9.7] + [(1 - 0.13)]^2 / 0.13] = 0.005 + 0.297 + 5.822 = \\ \Sigma \chi^2 &= 6.124\end{aligned}$$

Grados de libertad: $3 - 1 = 2$

$$P = 0.05$$

Esta población está en equilibrio de Hardy-Weinberg

Si hay equilibrio de Hardy-Weinberg,

$$p + q = 1$$

$$(p+q)^2 = p^2 + 2 pq + q^2 = 1$$

Por lo que hay equilibrio de Hardy-Weinberg (hay equilibrio genético).

DISCUSIÓN

Nuestro objetivo era saber la prevalencia de la mutación del factor V de Leiden en un subgrupo de la población de Uruguay, debido a que es una mutación que de encontrarse en un individuo aumenta sus riesgos trombo-embólicos. Además vimos en la Introducción, que se trata de una mutación muy común en las poblaciones europeas, por lo que podría tener una alta incidencia en Uruguay, ya que nuestro pueblo está formado principalmente por descendientes de europeos. Si bien nuestra población está formada también por descendientes de africanos e indígenas quienes presentan una mínima prevalencia para esta mutación (16), la población que analizamos (clase básicamente media y caucásica de Montevideo) está formada principalmente por descendientes europeos. La prevalencia de individuos portadores de la mutación encontrada fue de 4.79%; vemos que esta cifra se encuentra muy cercana al 5 % promedio de incidencia de la mutación en individuos europeos y más alejada del resultado que encontrara Gregg (7) en los hispanoamericanos en Estados Unidos. Debemos tener en cuenta que en los países europeos las variaciones de estos porcentajes son muy grandes: en Suecia la incidencia de individuos portadores del factor V de Leiden es de 12.5% y en Italia de 2.8% (6). A pesar de esto, vemos que en general la incidencia que encontramos con una cantidad de donantes representativos, para individuos portadores de la mutación es aproximadamente la misma que la de Europa, lo que era de esperar (en otros países de Latinoamérica, no es tan grande la ascendencia de europeos, lo que podría explicar la tasa más baja de la mutación en hispanoamericanos en USA).

En Uruguay se han hecho otros estudios, cuyos resultados nos fueron brindados por la Prof. Adj. Daniela Lens (Dpto. Básico de Medicina del Hospital de Clínicas), en que se encontró una prevalencia de la mutación de 2 % en 148 pacientes estudiados.

También conocemos las tasas para Brasil (2%) (12) y Argentina (2.5%) (13), por lo que en nuestro país y particularmente en Montevideo (como es la población estudiada) la importancia dada al screening y prevención de accidentes trombóticos debe ser mayor.

El hecho que esta mutación afecte casi únicamente a los individuos caucásicos (europeos, judíos, árabes israelíes e indios) y esté ausente en asiáticos (hay una baja prevalencia de la mutación en individuos afro-americanos (0.87%) debido a recientes mezclas raciales), sugiere un origen único de la mutación. Según Zivelin (15) ésta se haya originado después de la separación de los progenitores no-africanos de los africanos y la separación de los progenitores asiáticos de las poblaciones caucásicas (hace 21000 a 34000 años atrás).

Como ya hemos visto, la resistencia al APC puede aumentar el riesgo de trombosis durante cirugías, embarazo, uso de anticonceptivos orales, terapia de reemplazo hormonal, etc. El rol del factor V de Leiden en las trombosis pediátricas aún no ha sido completamente determinado. Aunque los coágulos venosos y arteriales se encuentran rara vez en la niñez, pueden ser mortales. Se ha demostrado que en niños y adultos la resistencia a la proteína C activada puede estar asociada con osteonecrosis (2). Como ya lo mencionamos, el riesgo es mayor en caso que la mutación de Leiden se encuentre asociada a otras alteraciones trombofílicas y a factores circunstanciales.

Como veremos más adelante, con el estudio de un caso específico, las indicaciones en cuanto al testeo del resto de la familia de un paciente a quien se le ha diagnosticado la mutación son controversiales. La heterocigocidad para el factor V confiere un riesgo aumentado de trombosis, por lo que por lo general se recomienda que se testee a toda la familia, para poder prevenir la enfermedad trombótica o tratarla

tempranamente (en especial en situaciones riesgo). Sin embargo, hay quienes consideran que este riesgo no es suficiente para motivar todo un screening familiar. Se produce angustia en los pacientes que se saben portadores de un defecto genético, además del riesgo de rechazo de seguros de salud y de los riesgos del tratamiento preventivo. En un estudio retrospectivo reciente (14) de miembros de familia de pacientes con factor V de Leiden y una historia de trombosis, la incidencia absoluta de tromboembolismo venoso en familiares con parentesco directo era sólo de 0.45% / año. Sin embargo, sería benéfico si una persona tiene la mutación en el caso de mujeres que vayan a usar anticonceptivos orales o que están cursando un embarazo o en el caso de familias con eventos trombóticos en edades tempranas. Por lo general, los miembros de la familia solicitan se les haga el estudio, aunque esto constituye un caso particular en cada caso. Los individuos homocigotos u heterocigotos para esta mutación deben ser aconsejados en cuanto a las implicaciones del diagnóstico. Específicamente, deben ser informados que aunque el factor V de Leiden es un factor de riesgo establecido, no predice una certeza de trombosis ya que los casos clínicos varían, aún dentro de una misma familia.

El test realizado en base a PCR para la detección de la mutación tiene sus ventajas y desventajas. Por un lado, el análisis de la mutación del gen del factor V tiene como ventaja que el resultado encontrado es claro: el paciente es normal o heterocigoto u homocigoto. No hay problemas de valores intermedios o imprecisos. No se necesita un test de confirmación ya que el diagnóstico es seguro. Los resultados del test se conocen en 48 horas. Además las muestras de sangre que se utilizan para realizar el test son fáciles de obtener ya que la sangre (mezclada con anticoagulante) es fácil de conseguir y se puede guardar ya sea fresca o congelada.

Sin embargo, las técnicas de amplificación de ADN tienen siempre un gran riesgo de contaminación. Por otra parte, estos tests no están adaptados para medir la función, por lo que no detectarán los defectos adicionales que contribuyen a la severidad de la resistencia al APC y a la tendencia trombótica.

SECCIÓN II: ESTUDIO DE UN CASO ESPECÍFICO PARA LA MUTACIÓN FV Q506 (LEIDEN)

ESTUDIO DE UN CASO

Determinación del status de la mutación de Leiden en tres generaciones de integrantes de una familia portadora de la mutación

Estudiamos un caso ilustrativo de la mutación de Leiden y la importancia de su testeo a nivel familiar. En 1998, el ginecólogo Dr. José Nader envió al laboratorio Genia para realizarse estudios de factores de riesgo trombóticos hereditarios a una paciente que pretendía empezar a tomar anticonceptivos y había sufrido una flebitis luego de dos semanas de quietud por hepatitis.

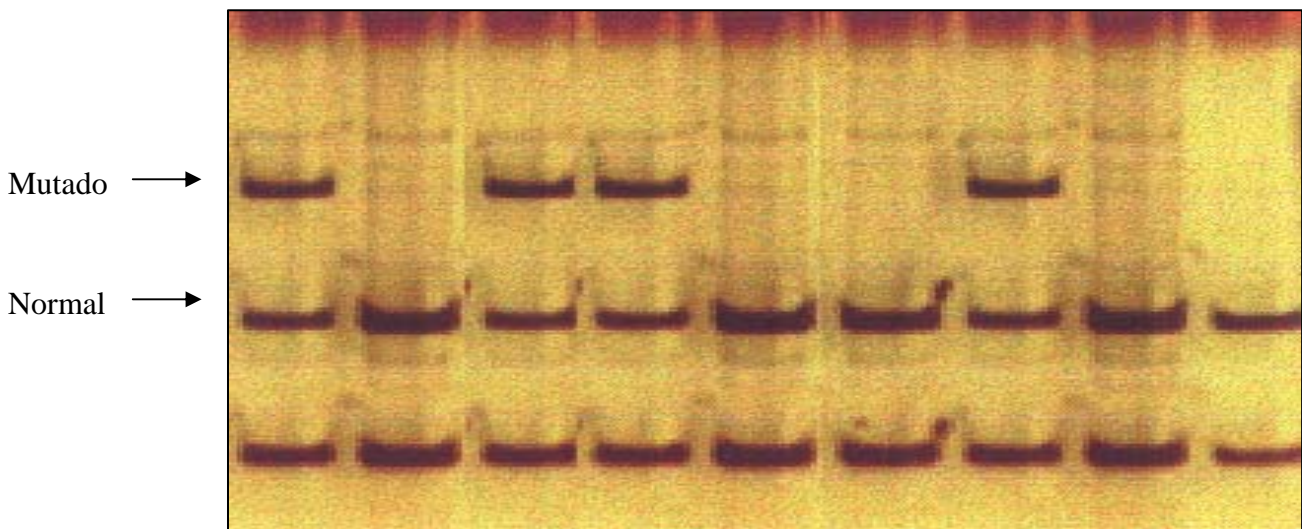
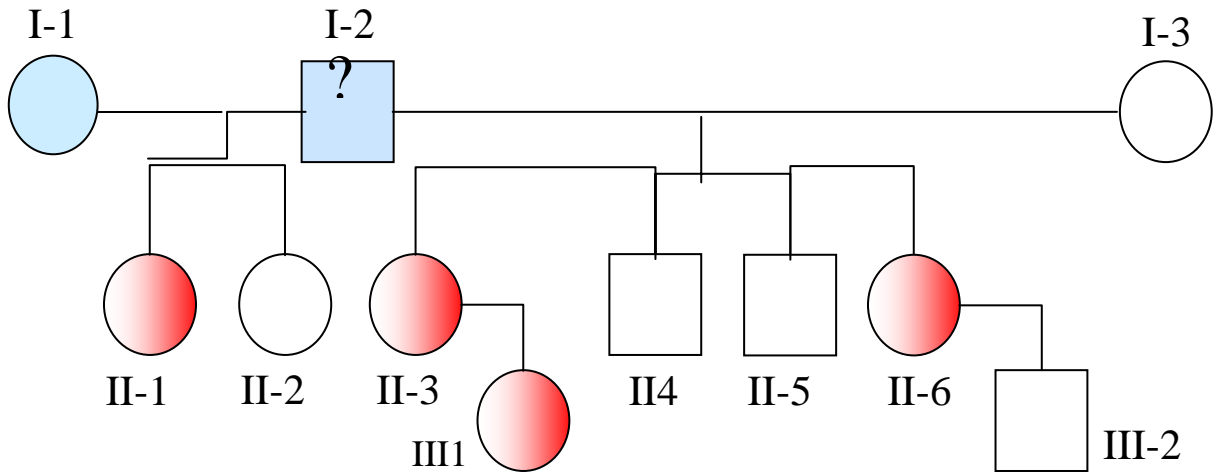
Al realizársele el estudio para la mutación de Leiden, se descubrió que era heterocigota para esta mutación (II-1, ver figura 4).

Se le realizó el estudio a los demás integrantes directos de su familia (Evaluación clínica a cargo del hematólogo Dr. Juan Carlos Cazerres) y se encontró lo siguiente:

- Su padre (I-2), ya fallecido, había presentado tromboembolismo pulmonar.
- Su madre, I-1, fallecida, no había presentado antecedentes trombóticos.
- Su hermana (II-2), asintomática y mutación de factor V negativa.
- La segunda esposa del padre, I-3, asintomática y mutación de factor V negativa.
- Una hermanastra, II-3, (hija de su padre y de su segunda esposa), asintomática (aunque fue intervenida quirúrgicamente varias veces), resultó ser heterocigota para la mutación de factor V.
- Otra hermanastra, II-6, también resultó ser heterocigota para la mutación de factor V. Había presentado flebitis post-parto. Sin embargo había tomado anticonceptivos durante menos de un año y enfrentó una cirugía estética sin complicaciones. Se recomendó profilaxis con heparina de bajo peso molecular en el período postoperatorio de una cirugía vascular.
- Otro hermanastro, II-4, asintomático y mutación de factor V negativa.
- Otro hermanastro, II-5, asintomático y mutación de factor V negativa.
- La paciente III-1, hija de II-3, resultó ser heterocigota para la mutación de factor V. Asintomática. Se le desaconseja el uso de anticonceptivos orales.
- Paciente III-2, hijo de II-6, asintomático y mutación de factor V negativa.

Ver figura 4 – Esquema de genealogía.

Figura 4 – Resultados del estudio del núcleo familiar de la paciente II-1



H N H H N N H N N

H: Heterocigoto – N: normal - (en azul fallecidos)

De este estudio podemos sacar dos grandes conclusiones:

- Vemos el carácter de herencia mendeliana autosómica dominante con penetrancia incompleta de la mutación de Leiden: un portador pasa el gen mutado a la mitad de sus hijos. Sólo aquellos que reciban una copia del gen alterado podrán a su vez pasarlo a su descendencia..
- Hay individuos que aún presentando la mutación no han tenido problemas trombóticos a lo largo de su vida.

Importancia del conocimiento de la resistencia a la proteína C activada para el paciente y su familia

Es importante para prevenir futuros eventos trombóticos. El paciente estará informado y se pondrán en marcha medidas de profilaxis cuando estén indicadas (cirugía, reposo prolongado, embarazo).

Hay opiniones encontradas en cuanto a la importancia de testear sistemáticamente antes de una operación a aquellas personas con antecedentes familiares y/o personales de trombosis venosas. Lo mismo ocurre con personas con estos antecedentes que quieran comenzar a usar anticonceptivos orales o estrógenos.

En cuanto a los seguros médicos, si la industria de los seguros tiene interés en cuanto a la posibilidad de mortalidad por esta condición, puede ser que se exija un screening previo a la aceptación de un seguro, ya que la terapia recibida una vez identificada la resistencia a la APC, puede reducir los riesgos de mortalidad. Sin embargo, se trataría de un nuevo tipo de discriminación...

Riesgo para la familia

Uno de los **padres de un paciente heterocigoto** para el factor V de Leiden presenta la mutación. Inclusive, dado que se trata de una mutación con una prevalencia importante, ocasionalmente uno de los padres puede ser homocigoto o ambos pueden llegar a ser heterocigotos.

Si uno de los padres es heterocigoto, **los hermanos** de un paciente heterocigoto tienen un riesgo de 50% de ser heterocigotos para el factor V de Leiden. Si ambos padres son heterocigotos, los hermanos del paciente tiene un 25% de probabilidades de ser homocigotos para la mutación, un 50 % de ser heterocigotos y un 25% de recibir los dos alelos normales.

Los hijos de un paciente heterocigoto tiene un 50% de chances de heredar el alelo mutado. Si la pareja del paciente es heterocigota, cada hijo tiene un 25% de probabilidades de ser homocigoto para la mutación, un 50 % de ser heterocigoto y un 25% de recibir los dos alelos normales. No se realiza testeo prenatal rutinariamente ya que no es una condición severa y existe terapia efectiva para tratarla aún en caso de homocigotos.

PUBLICACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Se elaboró un artículo científico con los resultados obtenidos:
“Predisposición genética a la enfermedad tromboembólica”
Autores: Carlos Sanguinetti, Juan Carlos Cazerres, Marie-Noël Bruné, Humberto Lima y Carlos Azambuja.
Publicado en revista “Tendencias en Medicina”, N°15, Setiembre 1999, pág. 138 – 143
- Además los resultados, junto a resultados obtenidos por el Dr. Juan Carlos Cazerres y el Téc. Lab. Humberto Lima aparecieron en el artículo:
“Prevalencia del factor V de Leiden en una población de donantes de sangre en Uruguay”
Autores: Cázerres J.C., Sanguinetti C., Lima H. Bruné M.N., Azambuja C.
Trabajo Ganador del Premio Roche del Congreso de:
 - I Encuentro Panamericano de Tecnólogos en Laboratorio Clínico
 - II Congreso Uruguayo de Tecnólogos en Laboratorio Clínico – 8 al 10 de Octubre de 1999.
- Los resultados fueron también presentados en la conferencia: “Medicina Predictiva: Estudio de las Mutaciones de Leiden y Protrombina” –
Conferencista: Dr. C. Azambuja - Autores: Juan Carlos Cazerres, Carlos Sanguinetti, Humberto Lima, Marie-Noël Bruné y Carlos J. Azambuja. – 2º Congreso Uruguayo de Bioquímica Clínica – Setiembre 1999 - p. 38 – 39

BIBLIOGRAFÍA

ESTUDIO DE MUTACIÓN DE LEIDEN

- 1) Baker R. Thrombophilia. RPH Laboratory Services 1997.
- 2) Glueck C.J., Brandt G., Gruppo R., Crawford A., Roy D., Tracy T., Stroop D., Wang P., Becker A. Resistance to Activated Protein C and Legg Perthes Disease. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. Nº 338, pp 139-152.
- 3) Taylor K. Annette. *Genetic Drift Newsletter*. 1997.
- 4) Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden. *Blood* 1995 Mar 15;85 (6):1504 - 8
- 5) Bertina R.M., Koeleman BPC, Koster T., Rosendaal F.R., Dirven RJ, de Ronden H., van del Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369:64-7.
- 6) De Stefano F, Chiusolo P, Paciaroni K, Leone G. Epidemiology of factor V Leiden: clinical implications. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24 (4): 367-79.
- 7) Gregg JP, Yamane AJ, Grody WW. Prevalence of the factor V-Leiden mutation in four distinct American ethnic populations. *Am J Med Genet* 1997 Dec 19;73 (3): 334-6.
- 8) Wiener-Megnani Z., Ben-Schlomo I., Goldberg Y., Shalev E. Resistance to activated protein C and the leiden mutation: high prevalence in patients with abruptio placentae. *Am J Obstet Gynecol* 1998 Dec; 179 (6 Pt 1): 1565 – 7.
- 9) Kujovich J., Goodnight S. Factor V Leiden Trombophilia. *Geneclinics* 1999.
- 10) Sanguinetti C., Díaz Neto E., Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PRC products separated on polyacrilamide gel. *Biotechniques* 1994; 17(5): 915 – 918.
- 11) Corral J., Iniesta J.A., González Conejero R., Vicente V. – Detection of factor Leiden from a drop of blood by PCR SSCP. *Thromb. Hemost.* 1996; 76 (5) 735 – 737.
- 12) Arruda VR., Annichino-Bizzacchi JM:, Costa FF., Reitsma PH., - Factor V Leiden is common in a Brazilian population. *Am. J. Hematol.* 1995; 49: 242-23.
- 13) Hepner M., Roldán A., Pieroni G., et al – Frequency of factor V Arg 506 to Gln mutation (FV Leiden) and activated protein C resistance in blood donors in Argentina. A preliminary study. *Thromb. Haemost.* 1997; 77 (Suppl): 226 (Abst).
- 14) Middeldorp S, Henkens CMA, Koopman MMW., et al (1998) – The incidence of venous thromboembolism in family members of patients with factor V Leiden mutation and venous thrombosis. *Ann Intern Med* 128: 15 – 20.
- 15) Zivelin A., Griffin JH, Xu X., et al – A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood* 1997; 89: 397 – 402.

- 16) Rees D., The population Genetics of Factor V Leiden. British Journal of Haematology, 1996: 579 – 586.
- 17) Castillo R. Escobar G, Bastida E. - Fisiología y exploración de la hemostasia. Hematología Clínica, 1994. Cap. 32: 481 – 491.

APÉNDICE II: LABORATORIO

- 1) Raúl E. Somma-Moreira. - Laboratorio de análisis clínicos– Prensa Latinoamericana – Montevideo.
- 2) OMS. “Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 1983.
- 3) Dra. Q.F. Graciela Borthagaray, Q.F. Carolina Márquez, Q.F. Ana Acevedo . - Manual de Bioseguridad – Laboratorio de Microbiología Clínica – Facultad de Química, 1992.
- 4) Maniatis, Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Segunda Edición.

APÉNDICE I: PROTOCOLOS DE TRABAJO PARA DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN DE LEIDEN (FVQ 506)

1) PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

Protocolo de extracción de ADN de PROMEGA “Wizard DNA Purification System” a partir de sangre (300 µl)

Otros materiales necesarios (aparte de los del kit):

- Tubos microcentrífugos de 1.5 ml
 - Baño de agua, 37°C
 - Isopropanol, temp. ambiente
 - Etanol 70%, temp. ambiente
- 1) Agregar 900 µl de Solución de Lisis Celular en tubo microcentrífugo de 1.5 ml estéril.
 - 2) Agitar suavemente el tubo de sangre hasta que esté mezclado, luego transferir la sangre al tubo con el líquido de lisis celular. Invertir el tubo 5 – 6 veces para mezclar.
 - 3) Incubar la mezcla por 10 min. a temp. ambiente (invertir 2 – 3 veces una vez durante la incubación) para lisar la células de sangre rojas. Centrifugar a 13000 – 16000 x g durante 20 segundos a temp. ambiente.
 - 4) Descartar todo el sobrenadante posible sin perturbar el pellet blanco. Quedará aproximadamente 10 – 20 µl de líquido residual en el tubo.
 - 5) Vortexear el tubo vigorosamente hasta que las células de sangre blancas se hayan resuspendido (10 – 15 segundos).
 - 6) Agregar 300 µl de Solución de Lisis Nuclear al tubo que contiene las células resuspendidas. Pipetear 5-6 veces para lisar las células de sangre blancas.
 - 7) Agregar 1.5 µl de Solución de Precipitación Proteica al lisado nuclear y vortexear vigorosamente por 10 – 20 segundos.
 - 8) Centrifugar a 13000 – 16000 x g durante 3 minutos a temp. ambiente. Se observa un pellet marrón oscuro.
 - 9) Transferir el sobrenadante a un tubo microcentrífugo de 1.5 ml limpio conteniendo 300 µl de isopropanol a temp. ambiente.
 - 10) Mezclar la solución por inversión hasta que se vean hebras blancas de ADN que forman una masa visible.
 - 11) Centrifugar a 13000 – 16000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se ve el ADN como un pequeño pellet blanco.
 - 12) Decantar el sobrenadante y agregar un volumen de etanol 70 % a temp. ambiente. Invertir suavemente el tubo varias veces para lavar el pellet de DNA y los lados del tubo. Centrifugar como en el paso 11.
 - 13) Aspirar con cuidado el etanol usando una pipeta Pasteur o un puntero de pipeta. El DNA del pellet está muy suelto en este momento y se debe evitar aspirar el pellet en la pipeta. Invertir el tubo en un papel absorbente limpio y secar el pellet al aire durante 10 – 15 minutos.
 - 14) Agregar 100 µl de Solución de Rehidratación de ADN al tubo y rehidratar el ADN incubando a 65°C durante una hora. Mezclar la solución periódicamente golpeando suavemente el tubo. Como alternativa, se puede rehidratar el ADN incubándolo ON a temp. ambiente o a 4°C.
 - 15) Almacenar el ADN a 2 – 8 °C.

Protocolo de Extracción de ADN según Kawasaki a partir de pellet nuclear.

(Se obtiene el pellet nuclear a partir del protocolo anterior de PROMEGA hasta el paso nº 5 inclusive).

- 1) Vortexear pellet
- 2) Poner en ependorff y vortexear: 50 μ l de Buffer K y 1 μ l de Proteína K. Agregar a la muestra-
- 3) Incubar a 55 °C por una hora
- 4) Pinchar tubos y poner a hervir (10 minutos una vez que el agua está hirviendo) en soporte flotante
- 5) Centrifugar 10 minutos
- 6) Congelar.

Protocolo de Extracción de ADN de InstaGene a partir de sangre

- 1) Agregar 3 – 6 μ l de sangre a 1 ml de agua autoclavada nanopura en un tubo microcentrífugo de 1.5 ml. Mezclar invirtiendo varias veces.
- 2) Incubar el tubo a temp. ambiente durante 15 – 30 minutos.
- 3) Centrifugar a 10000 – 12000 rpm por 15 – 30 minutos.
- 4) Quitar todo menos los 20 – 30 μ l de sobrenadante. No quitar el pellet.
- 5) Agregar 200 μ l de matriz InstaGene al pellet e incubar a 56 °C durante 15 – 30 minutos.
- 6) Vortexear a alta velocidad por 10 segundos. Colocar el tubo en baño maría durante 8 minutos.
- 7) Vortexear a alta velocidad durante 10 minutos. Centrifugar a 10000-20000 rpm durante 2 – 3 minutos.
- 8) Usar 20 μ l del sobrenadante resultante por 50 μ l de reacción de PCR. Almacenar el resto del sobrenadante a – 20° C. Cuando se vuelva a usar la preparación InstaGene, repetir el paso 7.

2) PROTOCOLOS DE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE AMPLIFICACIÓN Y DIGESTIÓN PARA FACTOR V DE LEIDEN

Solución de amplificación de Leiden

0.05 U/μL Taq ADN polimerasa – Recombinante, GIVCO (Life Technology)
0.25 mM de cada dNTP (deoxinucleótido tri-fosfato)
1.5 mM MgCl₂
2.5 mM KCl
10 mM Tris-HCl (pH 8.5)
0.25 μM de oligonucleótido iniciador FVf
0.25 μM de iniciador antisentido FVr

Se agrega 2 μl de ADN (20 ng) y se lleva a un volumen final de 25 μl

Solución de digestión 5 X

Tampón OPA (50 mM Tris-acetato (pH 7.5), 50 mM acetato de magnesio, 50 mM acetato de potasio)
50 ng / μl BSA (albúmina sérica bovina)
5 U / μl Mnl I (enzima de restricción)

Repartir 5 μl en cada tubo de digestión
Agregar 20 μl de ADN amplificado

3) PROTOCOLOS DE PREPARACIÓN DE GELES PARA ELECTROFORESIS

Preparación de gel de agarosa

- 1) Pesar en frasco: 0.2 g de agarosa y 19.8 g. De TAE 1 X (si es un gel al 1%, si es al 2 % son 0.4g de agarosa y 19.6 g de TAE 1X))
- 2) Hervir en microondas
- 3) Agregar 3 μ l de bromuro de etidio y entreverar
- 4) Poner en cubeta (con soportes puestos y peine) y esperar a que polimerice.
- 5) Cargar buffer
- 6) Cargar los patrones en orden decreciente
- 7) Cargar las muestras. Se carga muestra con buffer de cargada azul (2 μ l de buffer con 5 μ l de la muestra)
- 8) Correr a 60/80 V en Low.
- 9) Finalmente agitar en bromuro, lavar con agua y mirar con transiluminador.

Gel de poliacrilamida SDS PAGE (desnaturalizante al 6%)

Preparación de los vidrios

Antes de empezar pegar un pedazo chico de cinta en el lado que no se van a tratar.
Enjuagarlos bien con agua destilada
Pasarles alcohol y secar con papel higiénico

Vidrio chico (hidrofilico)

Poner en tubo eppendorf:
500 μ l de alcohol acético
2 μ l de bind silane

Dejar secar en campana durante 20 min.

Vidrio Grande (Hidrofóbico)

Pasarle 500 μ l de silicona esparciendo bien

Preparación de la poliacrilamida

Urea 7M

TBE 0.5 X

Acrilamida (19 a 1): bis 6%

Pesar la urea

Agregar componentes líquidos

Calentar 30 seg y repetir hasta que se disuelva la urea (No pasar de 40 °C porque se desnaturaliza la urea)

Ensamblado de los vidrios

Pasar nuevamente etanol 70 para sacar exceso de bind silane al vidrio chico

Al grande pasar sólo papel higiénico

NUNCA pasar el mismo papel higiénico para el vidrio fobo que para el filo.

Cuando todo está pronto para volcar la acrilamida agregar 25 μ l temed y 250 μ l APS al 10%

Después de volcar acordarse de colocar el peine con el lomo hacia el gel.

PROTOCOLO DE TINCIÓN DE GELES DE ELECTROFORESIS

Protocolo de tinción de plata según Carlos Sanguinetti

Fijador

30 ml etanol
1500 μ l acético
agua hasta 300 ml
Dejar 5 minutos

Solución de tinción

0.6 grs plata en 300 ml de agua

Dejar mínimo 8 minutos.
Lavar fugazmente con agua.

Revelar con:

9 grs NaOH en 300 ml de agua
1 ml formol

Cuando se alcanza la intensidad óptima, se neutraliza con fijador.

APÉNDICE II: REGLAS BÁSICAS DE TRABAJO EN LABORATORIO Y TÉCNICAS GENERALES DE UN LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

GENERALIDADES

Los objetivos básicos de un laboratorio, definidos por la OMS (Organización Mundial de la Salud) son los siguientes:

- 1) Cuando una enfermedad no es clínicamente evidente, se brindará el apoyo del laboratorio para ayudar al diagnóstico.
- 2) El laboratorio también es importante para decidir si es necesario llevar al paciente a otro nivel para completar el estudio o si es suficiente con enviar las muestras.
- 3) Asiste en el control de enfermedades comunicables.

Hay elementos imprescindibles para el buen funcionamiento de un laboratorio:

- Una buena administración
- Un buen diagnóstico
- Correcta toma de la muestra
- Medidas de bioseguridad
- Correcto mantenimiento
- Control de calidad y ética

En este caso, me concentraré a nivel de la **bioseguridad**.

BIOSEGURIDAD

El tema de la bioseguridad es muy importante ya que no sólo se debe evitar que los pacientes contraigan infecciones, sino que también se debe evitar que el personal que trabaja en el laboratorio se contamine y eventualmente contamine el ambiente que lo rodea. Además de protección al paciente, también se debe brindar protección al personal ya que a veces tendemos a pensar que somos invulnerables a la contaminación.

Es recomendable tener un **Comité de Bioseguridad** que elabore un **programa de bioseguridad** que tenga en cuenta los detalles locativos, de instalaciones e equipamiento y que deberá ser seguido por todo el personal del laboratorio. Este Comité deberá contar con un **Supervisor** y un **manual de bioseguridad** (referente a prevención de accidentes y qué hacer en caso de que ocurran). Es necesario elevar un informe ante los accidentes en laboratorio. También es importante dar cursos de bioseguridad a los empleados.

Los empleados, además de participar en la redacción de las normas de bioseguridad deben tomar medidas especiales:

- Usar equipos adecuados
- Aplicar procedimientos y técnicas correctas
- Informar los riesgos del laboratorio
- Informar todo accidente que ocurra en el laboratorio

PREVINIENDO ACCIDENTES DE TRABAJO

- **Generalidades**

- La precaución no es la misma frente a todos los agentes, materiales radiactivos, virus ...
A veces hay sólo riesgo personal y a veces el riesgo es comunitario. Además del riesgo personal frente a los materiales potencialmente “riesgosos”, tenemos el riesgo de contaminar materiales para quien venga a trabajar a continuación.
- Es bueno tomar medidas de precaución con el personal. Importan las vacunaciones, las alergias a drogas o medicamentos.
- El mal uso del equipo o material de trabajo también puede causar accidentes de trabajo, por lo que se debe cuidar la forma de trabajo.
- Los locales de trabajo deben contar con puertas de fácil acceso y abandono del local. El laboratorio debe contar con matafuegos y facilidades para las descontaminación.

- **Causas que aumentan la probabilidad de accidentes:**

- 1) Trabajo en ambientes reducidos, en desorden.
- 2) Exceso de personal y equipos para un espacio físico dado.
- 3) Equipos e instrumental con defectos y/o mal acomodados.
- 4) Lugar de trabajo sucio (con insectos, roedores,...). Piso húmedo o con restos de materiales resbaladizos.
- 5) No controlar el ingreso de personas ajenas al laboratorio (en especial niños).
- 6) Comer, fumar, beber, tomar mate o maquillarse en el ambiente de trabajo.
Guardar alimentos y bebidas en las heladeras destinadas a reactivos, muestras,...
- 7) No saber hacer las cosas o no hacerlas como se debe.
- 8) No considerar todo material como “de riesgo”.

Además de tener siempre en cuenta estas causas, hay **otras medidas de protección individual** que se pueden tomar para evitar accidentes:

- 1) No pipetear con la boca ni llevar objetos a la misma.

- 2) No comer, fumar, beber, tomar mate o aplicarse maquillaje en el laboratorio.
- 3) No tocarse cara, ojos, nariz, etc mientras trabajamos.
- 4) Lavarse las manos antes de ingresar y al irse del laboratorio o luego de trabajar con muestras biológicas.
- 5) Desinfectar la mesada con hipoclorito al 1 % vez una vez terminada la labor.
- 6) Reunir material y reactivos antes de comenzar un procedimiento técnico.
- 7) Usar una barrera de protección todo el tiempo.
- 8) Utilizar guantes para sangre o fluidos corporales. Evitar tocar los instrumentos o las instalaciones del laboratorio con esos guantes (se pueden usar en un sola mano o descontaminarse). Los guantes deben ser descartados en un recipiente de cartón con tapa.
- 9) Utilización de túnica y tapaboca para proteger de salpicaduras sólo dentro del laboratorio.
- 10) No correr dentro del laboratorio.
- 11) Evitar operaciones que produzcan aerosoles.
- 12) Tener una buena iluminación.
- 13) Lavado de manos si se contaminan.
- 14) Evitar heridas accidentales.
- 15) Intentar minimizar derrames y salpicaduras.
- 16) Aplicar las medidas sanitarias adecuadas: vacunas, limpieza, desinfección, esterilización, descontaminación, etc.
- 17) Utilizar un contenedor rígido para agujas y artículos punzantes.
- 18) Conocimiento completo del equipo y material utilizado, dejándolo siempre listo para ser utilizado por la siguiente persona.

- **Para descartar el material contaminado**

Es importante tener normas claras frente al desecho de material usado (siempre es potencialmente riesgoso)

- Descontaminar todo material biológico o potencialmente peligroso antes de descartarlo. Los desechos no contaminados pueden ser descartados en la basura corriente.
- Los objetos punzantes (agujas, tubos rotos, punteros de pipetas) se descartan en recipientes rígidos de cartón. Se autoclavan 30 min a 121 °C y se descartan en recipiente cerrado a la basura. También pueden ser incinerados antes de ser descartados.

- El material contaminado también debe ser incinerado o autoclavado antes de ser descartado para evitar accidentes con el personal de limpieza.
- Los medios de cultivo deben autoclavarse 30 min a 121 °C.
- El material contaminado que vaya a ser reutilizado debe ser autoclavado, limpiado y acondicionado para su re-uso.
- Los tubos de reacción y las placas de ELISA con las muestras se recogen en un recipiente de boca ancha con hipoclorito de sodio al 5%. Una vez autoclavados 60 min a 121° C, se descartan en bolsa de basura tras escurrir el líquido.
- Las túnicas y tapabocas se envuelven y autoclavan 30 min a 121°C y se reusan. Los guantes se descartan en una caja descartable debidamente rotulada y autoclavada antes de tirar.
- La bolsa de basura debe contener una etiqueta que diga: Material contaminado.

- **Para descontaminar soluciones de bromuro de etidio:**

Descontaminación de soluciones concentradas: (<0.5mg/ml)

- 1) reducir la concentración de la solución por debajo de 0.5 mg/ml por agregado de agua.
- 2) Agregar 1 vol de 0.5 M KMNO₄, mezclar y agregar 1 vol de HCl 2.5. Mezclar cuidadosamente y dejar a temperatura ambiente por 6 horas.
- 3) Agregar 1 vol de NaOH 2.5N. Mezclar cuidadosamente y descartar la solución.

Descontaminación de soluciones diluidas (0.5 mg/ml)

- 1) Agregar 100 mg de carbón activado por cada 100 ml de solución.
- 2) Agitar la solución durante una hora.
- 3) Filtrar la solución a través de filtro de Whatman N°1 y descartar el filtrado.
- 4) Descartar el filtro y el carbón activado en una bolsa de plástico, sellarla y depositarla en un recipiente para recolección de desechos tóxicos.

- **Antes de irse:**

- Guardar en su lugar los materiales biológicos, reactivos, etc., dejando el laboratorio en orden.
- Cerrar llaves de gas y desenchufar los aparatos eléctricos (recordar que los accidentes eléctricos pueden causar roturas de material contaminado).
- Limpiar y descontaminar el lugar.
- Quitarse la ropa de trabajo y lavarse bien las manos.

ANTE UN ACCIDENTE DE LABORATORIO:

- **Si se trata de un accidente con un instrumento punzante:**
 - Lavarse con agua y jabón, bajo el chorro de agua de la canilla.
 - Hacer sangrar.
 - Aplicar alcohol al 70%.
 - Identificar la posible contaminación. Conservar los restos de la muestra y los datos del paciente (si es una muestra).
 - Descontaminar del área del accidente.
 - Avisar al supervisor. Todo accidente debe ser registrado para evitar futuros accidentes similares.
 - Si se trata de una quemadura (con fuego, álcalis, ácidos, bromuro de etidio) lavarse con agua y jabón.
 - Descontaminar el área física donde se produjo el accidente.

- **Si se trata de un accidente biológico (rotura de ampolla con virus, ...):**
 - Evitar inhalación de aerosoles.
 - Evacuar el área.
 - Quitarse la ropa de trabajo y descontaminarla.
 - Avisar al supervisor y los otros funcionarios.
 - Esperar 30 minutos.
 - Reingresar al área con la ropa apropiada.
 - Limpiar con el desinfectante apropiado y dejarlo actuar.
 - Desinfectar toda el área.
 - Seguimiento médico.

Es aconsejable que **todo el personal esté vacunado contra la hepatitis B** y frente a un accidente con fluidos orgánicos investigar la existencia de HbsAg:

- Si es negativo, sólo se vacuna a la persona afectada
- Si es positivo o no se sabe: aplicar la primera dosis de la vacuna antihepatitis B y dar gamaglobulina anti hepatitis B por vía endovenosa..

MUESTRAS – MEDIDAS DE SEGURIDAD

- Para su transporte, utilizar recipientes rígidos cerrados.
- Intentar evitar roturas durante el transporte.
- Antes de guardarlas, examinar el envase y si se encuentran manchadas con líquidos fisiológicos, limpiarlo con hipoclorito de sodio al 5%.
- Las muestras de suero se guardan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en tubos tapados en posición vertical.

LABORATORIO GENIA

El nombre del Laboratorio Genia proviene del latín: parir o engendrar.

Se trata de un laboratorio de biotecnología orientado a la prestación de servicios

1) Descripción de la actividad del laboratorio

En el Laboratorio Genia, se sigue una rutina para los análisis de muestras:

- **Consulta:** previa en algunos tipos de análisis. A veces el análisis viene directamente desde un médico. También se realizan tomas de muestras de sangre o genitales o líquido cefalorraquídeo. Las muestras que se reciben de afuera deben venir acondicionadas con distintos medios y condiciones de transporte y en condiciones: por ejemplo, el líquido cefalorraquídeo y la orina llegan refrigerados; la sangre a llega a temperatura ambiente.
- **Recepción de la muestra:** Se ingresan los datos del paciente y se le adjudica un código fácil de rotular para evitar errores en la lectura de etiquetas. La muestra se mantiene a 4°C hasta el momento de realizar el estudio.
- **Aislamiento de ADN:** Se purifica el ADN de la muestra, eliminando posibles inhibidores de la reacción de PCR.
- **Amplificación:** Mediante PCR se amplifica la secuencia de ADN / ARN que se busca.
- **Análisis:** Las moléculas de ADN amplificadas se ordenan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.
- **Realización de un informe:** Confirmación del resultado. La directora Técnica, Quím. Farm. Carolina Marquez chequea los resultados obtenidos y elabora el informa.

2) Riesgos

La incorporación de una persona ajena al laboratorio con fines de aprendizaje representa en general un desafío ya que es necesario que el pasante conozca todos los riesgos y las conductas a tomar para evitarlos (se le vacuna contra la Hepatitis B, se le informa del riesgo de las muestras biológicas, se le entrega una copia del manual de bioseguridad).

Existen riesgos para el estudiante y para el laboratorio ya que su participación no tiene que alterar los procesos que aseguran un estándar adecuado de confiabilidad. Hay un responsable técnico ante el Ministerio de Salud Pública y la Ley: Q. F. Carolina Márquez que se encarga de tener los protocolos funcionando bien y asegura la calidad de los informes. **Se mantuvieron reuniones** con ella para esta etapa previa a la manipulación.

Los laboratorios en general se clasifican según su riesgo y niveles de bioseguridad en P1, P2, P3, P4. Genia es P1: **se cumple con las normas para trabajar con materiales patógenos.**

En mi caso particular, al estar trabajando con muestras de sangre, existen riesgos personales de salud.

Por un lado, existe la **contaminación biológica** a la que se está expuesta: hepatitis, HIV, otros virus. Para evitarla se toman las precauciones ya enumeradas en la sección anterior (guantes, máscara tapaboca, túnica,...).

Por otro lado, existe el riesgo de ante los **agentes físico-químicos**: Bromuro de etidio, rayos UV, acrilamida – El laboratorio, como política, sustituyó las sondas radiactivas por sistemas basados en quimioluminiscencia y en tinción con nitrato de plata, según los niveles de sensibilidad requeridos. Las técnicas de PCR en general por la gran amplificación de la muestra, se prestan a ser analizadas por métodos menos sensibles que los radiactivos, como el nitrato de plata.

Otros riesgos no menos importantes son los **riesgos de contaminación de muestras** por parte del pasante. Se debe tener mucha precaución tanto en el trabajo con las muestras biológicas como con los reactivos. Por encima de nuestro trabajo, se debe priorizar el trabajo de quien venga a trabajar luego de uno. No sería justo que se encontrara con sus herramientas de trabajo contaminadas.

Se hicieron controles de amplificación y de digestión con muestras tipo que contenían la mutación, así como chequeo periódico de los reactivos y consultas ante cualquier duda ya que es muy importante priorizar la seguridad del resultado para el paciente, a quien un resultado puede cambiar su vida tanto personal como familiar, como ya hemos analizado. Por lo **tanto la precisión de los resultados es una prioridad en todo momento.**

3) Organización del laboratorio en áreas de trabajo

El laboratorio GENIA se divide en tres áreas de trabajo:

- A) Zona de preparación de reactivos (no ADN, no llegan aquí las muestras)
- B) Zona PRE – amplificación de la muestra (Se trabaja con el ADN)

- C) Zona POST-amplificación de la muestra (Se trabaja con los productos amplificados)

ZONA PRE-AMPLIFICACIÓN

Para identificar los instrumentos y materiales pertenecientes a esta zona, los marcamos con una cinta verde. De hecho se utiliza también una cinta verde en la manga de la túnica que usamos para trabajar en esta zona para evitar entrar y trabajar con la túnica equivocada y de esta forma disminuir el riesgo de contaminación. Esta zona se encuentra en un espacio físico separado de la zona de POST amplificación.

Los equipos e instrumental que se encuentran en PRE son los siguientes:

- microcentrífuga
- vortex
- termobloque
- juegos de pipetas
- gradillas
- punteros resistentes a aerosoles (con filtro)
- heladera de PRE
- freezer de PRE

ZONA POST-AMPLIFICACIÓN

Para identificar los instrumentos, materiales y túnica de esta zona se utiliza una cinta roja.

Los equipos e instrumental que se encuentran en POST son los siguientes:

- Ciclador térmico
- Cubas de electroforesis
- Fuentes de poder
- Baño maría
- Trans iluminador
- Equipo de registro de imagen Polaroid y digital
- Sistema de tinción de geles
- Cuarto oscuro
- Freezer
- Heladera

Es muy importante, como ya dijimos que **nada del área de PRE pase a POST y viceversa**, por lo que todo está por duplicado (guantes, freezer, heladera para almacenamiento de reactivos, etc). Lo mismo ocurre con el área de preparación de reactivos.

4) Técnicas generales:

En el área de preparación de reactivos, se elaboran los reactivos evitando contaminaciones con la muestra.

En el **área de PRE**, se extrae ADN a partir de distintas muestras por los siguientes métodos:

- Chelex
- Salting-out (con el kit de PROMEGA)
- Fenolcloroformo. Este método no se realiza más para evitar la utilización de solventes orgánicos que son tóxicos. Necesitaríamos una campana de gases por la inhalación y además estos productos representan un problema para el medio ambiente.

En el **área de POST**, se realizan:

- Amplificación del ADN con el termociclador
- Cuantificación mediante electroforesis en geles de agarosa
- Digestión con enzimas
- Electroforesis en geles de poliacrilamida
- Tinción y visualización de los productos