

Predisposición a la trombosis

Desarrollo de kits diagnóstico

Por Jorge de los Santos, Germán Cota y Juan Andrés Abin*

El equipo de investigación y desarrollo de la empresa nacional ATGen Diagnostica ha desarrollado tres nuevos productos para su comercialización en el mercado regional. Se trata de kits para determinar la presencia de mutaciones puntuales en genes que codifican proteínas involucradas en la coagulación de la sangre. Los kits contienen los reactivos necesarios para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-RT).

Una mutación es una alteración en la secuencia de nucleótidos (1) que componen la molécula de ADN, y que se puede transmitir de progenitor a hijo. Estos cambios pueden clasificarse en cuatro tipos básicos: inserciones, deleciones (o falta de una porción), reordenamientos y sustituciones de nucleótidos, y se denominan polimorfismos genéticos si se encuentran en la población con una frecuencia mayor al 1%.

El desarrollo realizado por los autores de esta nota, se centró en un tipo particular de mutaciones que implican la sustitución de nucleótidos en una única posición de la secuencia. Estas sustituciones se denominan polimorfismos de nucleótido único o SNP por sus siglas en inglés.

En la última década y como consecuencia directa del proyecto genoma humano, así como debido a los avances en las técnicas de secuenciación del ADN, el número de SNPs reportados ha aumentado exponencialmente a más de 10 millones.

La mayoría de los SNPs encontrados en el genoma humano no tiene repercusión directa en la salud de los individuos que los portan. Sin embargo algunos pueden representar un riesgo, ya que es posible asociar su presencia con una mayor frecuencia en la aparición de enfermedades tales como cáncer, diabetes, infecciones virales, enfermedades vasculares y desórdenes mentales. Por lo que su detección resulta muy valiosa en medicina preventiva, ya que permite al médico leer el perfil genético de su paciente y aplicar una terapia adecuada, así como reducir algunos factores de riesgo, salvaguardando su salud.

En este sentido, se han realizado importantes inversiones a nivel mundial con el objetivo de caracterizar y mapear nuevos SNPs en el genoma humano asociados a enfermedades.

Predisposición a la trombosis

El proceso de coagulación implica una serie de reacciones enzimáticas encadenadas de tal forma que actúan en cascada, amplificándose y reclutando en cada paso un número mayor de moléculas. Dicha cascada es controlada de forma rigurosa por proteínas llamadas "Factores de coagulación sanguínea", (las principales son trece y se simbolizan con la F de Factor más un número romano). Un desequilibrio en estos factores puede conducir a un exceso de coagulación (trombosis) o a una deficiencia de la misma (tendencia a la hemorragia).

Los SNPs asociados a la cascada de coagulación sanguínea más relevantes desde el punto de vista clínico son: a) La mutación de Leiden, que es una mutación en el gen que codifica para la producción del Factor cinco de la coagulación sanguínea (FV), donde hay un cambio de la base nitrogenada Guanina por Adenina en

el nucleótido 1691 (FV 1691G/A); b) la mutación conocida como Protrombina 20210A/G en el gen que codifica para el Factor II de la coagulación (FII), implica un cambio de base Guanina por Adenina en la posición 20210 (FII 20210G/A) y c) la mutación en el gen que codifica la enzima Metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) generada por un cambio de Citosina por Timina en la posición 677 (MTHFR 677C/T).

En los individuos portadores de al menos uno de estos tres SNPs, se genera un desbalance en el proceso de coagulación sanguínea debido a que ésta no se reprime correctamente. Esta alteración, genera una propensión a formar coágulos de fibrina y células en la sangre.

La mutación de Leiden aumenta el riesgo de sufrir trombosis venosa en un factor mayor de 10 para individuos que

han heredado los genes mutados de ambos padres, o sea homocigotas (2) para esa mutación. Por otra parte, los individuos con una sola copia mutada, heterocigotas, heredada de padre o madre, incrementan entre 2 y 10 veces el riesgo de trombosis.

En los individuos que presentan al mismo tiempo la mutación de Leiden y la mutación Protrombina 20210A/G, la probabilidad de sufrir eventos tromboticos se multiplica. Los individuos con la tercera mutación señalada, que adquirieron la mutación de ambos padres, o sea homocigotas para la mutación, también presentan mayor riesgo de trombosis asociada a la falta de actividad de la enzima MTHFR, no así los individuos heterocigotas.

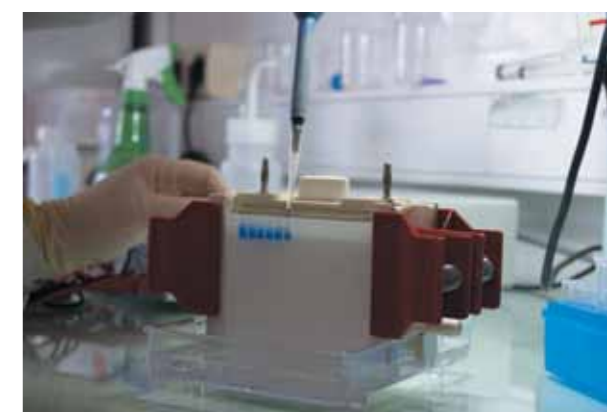
En Uruguay

La trombosis en Uruguay está presente en un alto número de individuos, 1 de cada 1.000 la padecen. La mortalidad por esta enfermedad se asocia fundamentalmente a la formación de trombos (coágulos) en pulmones y a la pérdida de embarazos recurrentes. En Uruguay, un estudio del 2004 determinó que en el 65 % de las pérdidas recurrentes de embarazos estaba presente al menos uno de los tres principales SNPs asociados a la cascada de coagulación. En estos casos el tratamiento se basa en la administración regular del anticoagulante heparina durante el embarazo.

En este escenario la medicina preventiva es de suma importancia por la posibilidad de identificar a los pacientes con predisposición genética a sufrir trombosis y su tratamiento profiláctico temprano.

La terapia con estrógenos (por ejemplo durante la menopausia), la obesidad, el tabaquismo, la diabetes mellitus, y la estasis venosa por trauma o inmovilidad, son considerados factores de riesgo para la trombosis. Si a éstos se suma la presencia de una o varias de las mutaciones descritas, el riesgo es mucho mayor. Los portadores deberían reducir al mínimo dichos factores o, de no ser posible, someterse a tratamiento con anticoagulantes.

Es por esto que el análisis clínico de los SNPs es indicado por el personal médico a individuos en las condiciones mencionadas. También se indica a personas menores de 45 años que hayan experimentado trombosis venosa o embolismo pulmonar, a individuos con familiares portadores de la mutación y especialmente a mujeres embarazadas que



que hayan sufrido la pérdida de embarazos en forma recurrente.

Análisis clínico

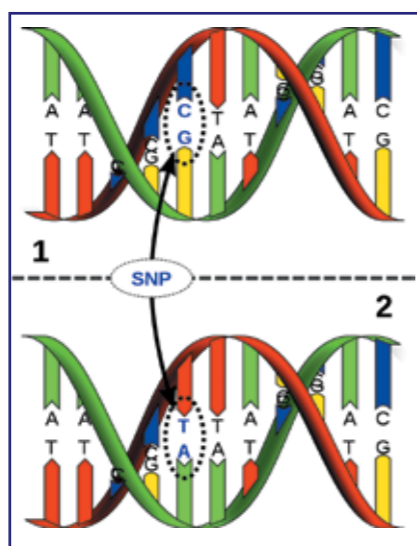
La técnica de referencia en el estudio de SNPs es la amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (3) y posterior digestión con enzimas de restricción (RFLP por sus siglas en inglés). Estas enzimas reconocen el sitio del ADN donde se encuentra la mutación y escinden la molécula. Posteriormente los fragmentos se visualizan al realizarse una electroforesis en gel de agarosa o acrilamida. La técnica determina la presencia o ausencia de mutaciones en 9 horas aproximadamente.

Una variante más moderna, la PCR en tiempo real (PCR-RT), se utilizó en el desarrollo del kit. Desde que se reportó por primera vez el uso de esta técnica se adoptó rápidamente en laboratorios de investigación y clínicos de todo el mundo Su éxito es debido a que además de detectar, cuantifica el número de copias y también a que los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en un tubo cerrado sin necesidad de ningún procedimiento posterior, mientras que en la técnica tradicional de PCR el resultado es visualizado en una tercera etapa, al realizar una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida.

La ventaja entonces de la PCR-RT es que acorta el tiempo de reacción y minimiza los pasos, evitando errores en la manipulación de las muestras, lo que conlleva la posibilidad de contaminación, cuantifica el número de copias y además el proceso es factible de ser automatizado.

La detección se logra utilizando marcadores fluorescentes (sondas) cuyas secuencias les permiten pegarse a la región del ADN que contiene el SNP. Inmediatamente después de la amplificación de la región del ADN conteniendo el SNP se realiza la desnaturalización de la sondas y del ADN amplificado por aumento gradual de la temperatura midiendo continuamente la emisión de luz o fluorescencia. Si la mutación se encuentra presente en el ADN se necesita mayor energía para la desnaturalización, lo que se visualiza al graficar los valores de fluorescencia en función de la temperatura.

La estrategia aplicada es útil para clasificar a los pacientes en homocigotas normales si ambas copias del gen no son mutadas; heterocigotas, si solo una de ellas



es mutada; y homocigota mutado, cuando ambas copias del gen presentan la mutación.

Desarrollo nacional

El desarrollo consistió en el diseño de sondas fluorescentes, los reactivos y las condiciones experimentales que permiten amplificar y detectar los fragmentos de los genes FV, FII y MTHFR que contienen o no SNPs. Las reacciones para cada uno de los genes se realizan por separado utilizando los reactivos provistos en cada kit.

En la práctica, el ensayo se realiza partiendo de un pequeño volumen de muestra de sangre del paciente a partir del cual se purifica el ADN. El ADN obtenido se coloca en un microtubo con los reactivos del correspondiente kit y éste se coloca en el equipo donde se lleva a cabo la reacción de PCR-RT. En el transcurso de una hora y media es posible leer los resultados y determinar si el paciente tiene o no la mutación y si éste la heredó de ambos padres (homocigota mutado) o de un único progenitor (heterocigota).

Los tres kits para detectar mutaciones implicadas en la regulación sanguínea se han validado y registrado ante el Ministerio de Salud Pública. Basados en la tecnología de PCR en Tiempo Real se ha disminuido el número de etapas, tiempo y costos asociados a la técnica de detección de SNPs y aumentado la reproducibilidad del diagnóstico en comparación con la técnica de referencia PCR RFLP. Los kits permiten implementar esta tecnología de forma sencilla y estandarizada en los laboratorios de diagnóstico clínico que emplean biología molecular. En la actualidad se trabaja en la posibilidad de detectar los SNPs en una única reacción de PCR-RT.

Notas

1. Un nucleótido es la unidad estructural de la molécula de ADN. Se compone de un azúcar (desoxirribosa), una de las cuatro bases nitrogenadas (citosina, C; timina, T; adenina, A; y guanina, G) y un fosfato que actúa de enlace con el siguiente nucleótido. Hay cuatro tipos de nucleótidos dependiendo de la base nitrogenada que contienen. El orden en el que están enlazados los nucleótidos en la cadena de ADN determina lo que se conoce como secuencia del ADN.

2. Homocigotas - Heterocigotas: Los genes se encuentran distribuidos en cromosomas. Cada persona tiene 46 cromosomas agrupados en 23 pares. En cualquier par de cromosomas, un miembro del par es heredado del padre y el otro de la madre por lo tanto hay 2 copias de cada gen en un individuo dado (excepto para los genes en los cromosomas sexuales). Los genes pueden tener variantes en la población, es decir, el mismo gen puede ser levemente diferente de un individuo a otro. Si una persona hereda dos variantes de un gen en un par de cromosomas, uno del padre y otro distinto de la madre, esta persona se denominará heterocigota para ese gen, si son iguales, será homocigota para ese gen.

3. PCR: (Polymerase Chain Reaction): es una técnica de biología molecular que permite aumentar el número de copias de una secuencia de ADN en cantidad suficiente para que posteriormente pueda ser analizada. PCR en tiempo Real: Es una variante de la técnica de PCR que permite cuantificar la cantidad de ADN producido en forma continua mediante el uso de moléculas fluorescentes capaces de unirse al ADN.

* Los Lic. Jorge de los Santos y Germán Cota y el Dr. Q.F. Juan Andrés Abin son integrantes del equipo de I+D de ATGen. Agradecen a: Carlos Sanguinetti, Gonzalo Greif, Sofia Tedesco y Fabricio Sarlos por sus aportes al trabajo realizado.



ATGen
VALDENSE BIOTÉCNICA

Con la misión de brindar soluciones en el área del diagnóstico in-vitro aplicadas a la salud humana proporcionamos productos y servicios de calidad y seguridad, generando valor sustentable a través de la innovación y los desarrollos.

Desarrollamos kits de diagnóstico molecular enfocados en enfermedades infecciosas, desórdenes genéticos y factores de predisposición.

También contamos con una línea de inmunodiagnósticos de desarrollo propio, enfocada en la detección serológica de enfermedades infecciosas ofreciendo soluciones innovadoras, costo-efectivas y confiables para el laboratorio clínico, bancos de sangre y la investigación en salud humana.

ATGen-DIAGNÓSTICA
Valdense 3616, Montevideo
Teléfono 2336 5446



PEDECIBA festejó 25 años

En octubre de 2011 se cumplieron 25 años de la creación del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), que ha sido uno de los instrumentos más exitosos en favor del desarrollo científico del Uruguay y se proyecta que continúe como tal en el futuro.

Se festejó el día 21 con un foro en el Edificio José Artigas (anexo del Palacio Legislativo) en el que se habló sobre el impacto y las perspectivas de PEDECIBA, y se analizaron temas como los procesos de evaluación tanto en forma general, en ciencias, de investigadores, proyectos y otros, como en particular de los mecanismos usados por PEDECIBA para alcanzar su misión. También se trataron las limitantes prácticas al desarrollo de las actividades de investigación experimental y las necesidades y preocupaciones de los estudiantes del programa.

En forma paralela hubo actividades de divulgación con ponencias por parte de investigadores de las 6 áreas y una exposición titulada "25 Años de PEDECIBA" con fotos preparadas por investigadores del área Biología y videos de divulgación científica seleccionados de las Series 1 y 2 de "¿Qué Es?" de todas las áreas.

La actividad comenzó en la mañana con una mesa redonda integrada por el director del programa Dr. Enrique Lessa y los Dres. Andrés Peri, Judith Sutz, Omar Macadar y Raúl Donangelo quienes aportaron una visión histórica interna y externa de PEDECIBA, de cuál ha sido su impacto y cuál debería ser su rol en el futuro del país, extrayéndose desafíos interesantes a abordar en el futuro.

Se continuó con una ceremonia de celebración, en la cual participaron el Dr. Enrique Lessa, el Dr. Rodrigo Arocena, rector de la Universidad de la República (UdelaR),

la entonces vice ministra del Ministerio de Educación y Cultura (MEC), Ing. María Simón, El Sr. Antonio Molpeters del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo y el diputado Walter de León, presidente de la Comisión Especial de Innovación, Investigación, Ciencia y Tecnología de la Cámara de Representantes quien hizo entrega a PEDECIBA de una placa conmemorativa en sus 25 años de trayectoria.

Por la tarde, con la participación del Dr. Rodolfo Gambini, integrante del directorio de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación y ex director de PEDECIBA, Dr. Gustavo Folle, del Instituto de Ciencias Biológicas Clemente Estable, Dr. Gregory Randall, Pro-rector de Investigación de la UdelaR, Ing. María Simón del MEC y la Dra. María H. Torre, subdirectora de PEDECIBA, se hizo entrega de los premios "Roberto Caldeyro Barcia 2011" a los Dres. Cecilia Casaravilla, Alejo Menchaca, Álvaro Martín y Gabriel Usera.

Interesó particularmente la presencia de numerosos estudiantes del programa dotando a la jornada de celebración de gran frescura y dejando en claro que el futuro del programa está asegurado desde el punto de vista del material humano.

Se apreciaba, en el tono positivo de los disertantes, la satisfacción con lo logrado y el entusiasmo para continuar construyendo el conocimiento científico que nutre a la academia y el sistema de innovación del país, haciendo los ajustes necesarios para acompañar al programa con los rápidos cambios de la realidad científica actual.

El director del programa declaró: "El PEDECIBA es un programa que está definido como permanente, pero en permanente renovación..."

