

Programa de Postgrado de Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Tesis de Maestría en Biotecnología



**Desarrollo de kits para
genotipado de SNPs en los genes
humanos FII, FV y MTHFR,
utilizando la tecnología de PCR en
Tiempo Real**

Montevideo, agosto 2013

Lic. Jorge De los Santos

ATGen-Diagnóstica, Laboratorios Celsius S.A

Tutor de Tesis: Dr. QF. Juan Andrés Abin

Tutor Académico: Dr. Otto Pritsch

ÍNDICE

Resumen.....6

Glosario de abreviaturas

I. Introducción.....10

1.1 Introducción a la hemostasis sanguínea

1.2 Introducción a la cascada de coagulación sanguínea

1.2.1 Vía extrínseca

1.2.2 Vía Intrínseca

1.2.3 Vía común

1.3 Regulación de la cascada de coagulación y el sistema fibrinolítico

1.3.1 Inhibición de la coagulación.

2- Introducción a las enfermedades trombofílicas

2.1 Bases moleculares de la trombofilia hereditaria

2.2 Factor V de la coagulación sanguínea

2.2.1 Mutaciones puntuales en el gen del Factor V

2.3 Factor II de la coagulación sanguínea

2.4 La enzima Metilentetrahidrofolatoreductasa

2.4.1 Mutaciones puntuales en el gen de la enzima

Metilentetrahidrofolato reductasa

3 Antecedentes de la tecnología de PCR en Tiempo Real

3.1 Detección y clasificación de SNP por curvas de desnaturalización

3.2 Plataformas de PCR en Tiempo Real, tipos tendencias y compatibilidad

4. Antecedentes de la empresa

4.1 Oportunidad de desarrollo tecnológico

II. Objetivos.....36

1. Objetivos generales

2. Objetivos específicos

III. Materiales y Métodos.....37

1 Estudio del molde para reacción de PCR en Tiempo Real

2 Extracción de ADN

3 Evaluación de la extracción de ADN genómico

4 Evaluación del efecto de la temperatura en el ADN genómico

5 Diseño de cebadores y sondas para PCR en Tiempo Real

6 Optimización del PCR en tiempo final

7 Desarrollo y estandarización del ensayo de PCR en Tiempo Real

8 Integración de los componentes en kits

9	Estudio del límite de detección para cada Kit	
10	Estudio de la especificidad y sensibilidad de los métodos de diagnósticos en muestras clínicas	
10.1	Validación interna	
10.2	Validación externa	
11	Estudios de limitaciones e interferencia	
12	Estabilidad de los kits en función de la temperatura de almacenado	
13	Análisis de costos para cada kit	
14	Producción GMP y registro de los kits ante el Ministerio de Salud Pública	
IV	Resultados y discusión.....	53
1	Extracción del ADN genómico	
2	Estudio de la estabilidad del ADN genómico en diferentes temperaturas de almacenado	
3	Optimización del PCR en tiempo final	
4	Estandarización del PCR en tiempo real	
5	Diseño del producto final	
6.	Estudio del límite de genotipificación de los kits Factor II Real Time (RG), MTHFR (C677T) Real Time (RG) y Factor V Real Time (RG)	
7	Estudio de la especificidad en la caracterización genética	

8 Estudio de las limitaciones e interferencias en cada kit	
9 Estabilidad de los kits en función de la temperatura de almacenado	
10 Análisis de costos	
V. Conclusiones.....	77
VI. Agradecimientos.....	81
VII. Bibliografía.....	82
Anexos	
1. Moléculas fluorescentes.....	88
2. Instructivos de Kits.....	92
3. Cotizaciones de diseñadores	119
4. Publicaciones asociadas.....	124

RESUMEN

Algunos polimorfismos de nucleótidos únicos, (SNPs por sus siglas en inglés), son estudiados a nivel poblacional como marcadores genéticos de diferentes enfermedades. La presencia de algunos SNPs en humanos, en genes que participan en la cascada de coagulación sanguínea, generan un desbalance de la misma, exacerbando la formación de coágulos sanguíneos. Estos, una vez libres en el torrente sanguíneo, pueden obstruir la luz de venas de menor calibre, fenómeno que se denomina trombosis venosa. Durante el presente trabajo se estudiaron tres SNPs asociados al aumento de riesgo de generar eventos trombóticos: la mutación G1691A en el gen que codifica para el Factor V, la mutación G20210A en el gen que codifica para el Factor II y el polimorfismo C677T en el gen que codifica para la enzima metilentetrahidrofolato reductasa. La formación de coágulos o trombosis venosa es un problema médico frecuente en nuestro país, de modo que su diagnóstico y profilaxis puede evitar complicaciones vasculares, por ejemplo durante el embarazo.

Por este motivo, nos propusimos desarrollar tres kits independientes para detectar, amplificar y genotipar dichos SNPs, aplicando la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real. La estrategia experimental implicó el diseño de cebadores que amplifican la región que posee el SNP, y de dos sondas internas que hibridan en la zona del polimorfismo. De esta forma, y basándonos en el hecho que una

mutación puntual genera diferentes perfiles en la curvas de desnaturalización, se puede discriminar entre los genotipos normal, mutado y heterocigota.

La técnica desarrollada fue validada mediante el análisis de 250 muestras de sangre por cada polimorfismo, y se compararon los resultados obtenidos por PCR en tiempo real con la técnica de referencia PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Estos ensayos se realizaron en nuestro laboratorio por lo que se denominaron ensayos de validación interna. En contraposición a los realizados con muestras enviadas por otros laboratorios internacionales y nacionales denominados ensayos de validación externa. En este último los resultados del genotipo se obtuvieron por diferentes técnicas moleculares.

Los estudios de estabilidad sobre los kits producidos ante diferentes temperaturas de almacenado, garantizan una vida útil de 18 meses a partir de la fabricación y especifican las condiciones de almacenado. Los kits desarrollados combinan una excelente sensibilidad y especificidad, reducen significativamente la manipulación y los tiempos en comparación con la técnica PCR-RFLP.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNg: ácido desoxirribonucleico genómico

ADP: adenosin 5' fosfato

ARN: ácido ribonucleico.

CAP: colegio americano de anatomopatología (*College of American Pathologist*)

Factor VW: factor Von Willebrand de la cascada de coagulación sanguínea

FRET: transferencia de energía fluorescente por resonancia. (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

FT: factor tisular. Denominado también factor tisular de tromboplastina o factor III

FV: factor cinco de la coagulación sanguínea

FVa: factor cinco de la coagulación sanguínea, en su forma activada

FII: factor dos de la coagulación sanguínea

FIIa: factor dos de la coagulación sanguínea, en su forma activada

FIII: factor tres de la cascada de coagulación sanguínea

FX: factor diez de la cascada de coagulación sanguínea

FXa: factor diez de la cascada de coagulación sanguínea, en su forma activada

GMP: buenas prácticas de manufactura (*good manufacturing practice*)

GPIIb/IIIa: glicoproteína IIb/IIIa

HMWK: quinínogeno de alto peso molecular

MTHFR: enzima metilentetrahidrofolatoreductasa

PC: proteína C

PCA: proteína C activada

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCR RT: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

PCR RFLP: reacción en cadena de la polimerasa seguido de fragmentación con enzimas de restricción. (RFLP: *restriction fragment length polymorphism*)

SVP: sistema venoso profundo

SNP: polimorfismo de nucleótido único, (SNP: *single nucleotide polymorphism*).

TEP: tromboembolismo pulmonar

TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular (*tissue factor pathway inhibitor*)

Tm: Temperatura de melting, o temperatura de disociación del ADN. Donde la mitad de la las moléculas en solución esta simple hebra y la otra mitad doble hebra.

TV: trombosis venosa

TVP: trombosis venosa profunda

TxA2: tromboxano A2

I-INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción a la hemostasis sanguínea

Cuando se produce daño tisular, se promueven diferentes procesos que evitan la pérdida de sangre. Estos procesos se activan rápidamente e involucran cambios a nivel macroscópico (vasoconstricción local), celular (agregación de plaquetas) y molecular (activación de la cascada de coagulación sanguínea). Bajo condiciones fisiológicas la sangre se mantiene en estado fluido. Sin embargo frente a una lesión vascular, el sistema hemostático permite detener rápidamente el sangrado, taponando las posibles lesiones vasculares (Napolés *et al.* 2012). La hemostasis es un conjunto de mecanismos que permite controlar la hemorragia sanguínea y mantener a la sangre en estado fluido, los principales componentes son la pared de los vasos sanguíneos, las plaquetas, el sistema de coagulación y el sistema fibrinolítico (Tengborn, 2012).

En la homeostasis primaria la primera acción, está dada por la constricción de los vasos sanguíneos lesionados, lo que facilita la adherencia y agregación de plaquetas en la zona lesionada, dando lugar a la agregación plaquetaria. El sistema de coagulación permite estabilizar este agregado por acción de la fibrina. Luego de la acción de la homeostasis primaria y la coagulación sanguínea tiene lugar la fibrinólisis que es la encargada de eliminar la fibrina de la sangre y disolver el coagulo sanguíneo (Arderiu *et al* 1998).

Los procesos de formación del trombo, se clasifican en: adhesión de las plaquetas a la zona dañada, activación y agregación plaquetaria. En una primera instancia, cuando se daña el tejido interno de los vasos sanguíneos o endotelio, se exponen glicoproteínas de adhesión como el colágeno, factor Van Willebrand (VW), vitronectina y trombina (Rodak 2004). Las plaquetas son reclutadas a la zona dañada y activadas donde sufren cambios en sus receptores de membrana, siendo el más importante la glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa). Estos receptores activados se adhieren por medio de trombina, a otras plaquetas activadas lo que se denomina adhesión plaquetaria. Las plaquetas cambian de forma durante la activación debido a cambios conformacionales en el citoesqueleto, lo que permite la desgranulación plaquetaria. La activación y adhesión plaquetaria en su conjunto forman la placa primaria hemostática (Osinaga 1999). Otra vía de activación de plaquetas es por medio del Factor Tisular (FT), este factor en sangre activa la trombina la que permite la activación de plaquetas, (Rodak 2004). También desencadena la cascada de coagulación como se detalla más adelante.

Tanto por la vía del colágeno expuesto con el factor de VW o por acción del factor tisular, las plaquetas activadas liberan al medio extracelular diferentes moléculas. Entre las más importantes se destacan: tromboxano A₂ TxA₂ (prostagandina activador de plaquetas), adenosin 5' fosfato (ADP), iones de calcio Ca²⁺, factor VW y quinínogeno de alto peso molecular (HMWK) entre otros. Estas moléculas generan un microambiente capaz de amplificar la activación y adhesión de otras plaquetas en el torrente sanguíneo, favoreciendo la agregación de plaquetas y la coagulación local (Willima 2005).

1.2 Introducción a la cascada de coagulación sanguínea

Desde la década del 60 hasta ahora se han investigado y propuesto diferentes modelos, para explicar los procesos moleculares de la coagulación sanguínea. Estos modelos proponen una secuencia de pasos en los cuales la activación de un factor de la coagulación, da lugar a la activación de varios factores sucesivos (Soria 2009), lo que se denomina reacción en cascada. Finalmente las proteínas de fibrinógeno en sangre se vuelven insolubles, formando una red de fibrina capaz de atrapar células (Zwaal & Hemker, 1986). A continuación se detalla el mecanismo de la cascada de coagulación y los principales factores involucrados.

1.2.1 Vía extrínseca

El FT es una glicoproteína integral de membrana que se expone a la sangre cuando se produce una lesión en la pared del vaso sanguíneo. Entonces el factor VII (FVII), una proteína vitamina-K dependiente, se une al FT expuesto y se activa rápidamente (FVIIa). El complejo FVIIa/FT es capaz de activar el factor X (FX) y el factor IX (FIX) pasando a FXa y FIXa respectivamente (Mackman 2009). El FXa permanece en la superficie celular y puede combinarse con el FVa para llegar a producir trombina, la cual juega un papel muy importante en la activación plaquetaria, como se describe a continuación, ver Figura 1. (Spronk *et al.*, 2003).

1.2.2 Vía Intrínseca

La vía intrínseca es un mecanismo alternativo de activación, del sistema de la coagulación (Figura 1). Están implicados el FXI, el quininógeno de elevado peso molecular (HMWK) y la precalicreína como cofactores. La activación del FXII (FXIIa) produce la activación del FXI (FXIa). El FXIa activa al FIX (FIXa) junto con el factor VIII activando de esta manera el Factor X y comenzando la vía común (Spronk 2003).

1.2.3 Vía común

La vía común de la cascada de la coagulación (Figura 1) se inicia por la activación del FX ya sea por la vía intrínseca o extrínseca. El siguiente paso es la activación del FV, el cual forma un complejo con el Factor Xa sobre la superficie fosfolipídica celular en presencia de iones Ca^{2+} . Este complejo cataliza la conversión de la protrombina (Factor II) a su forma activa, la trombina (Factor IIa) (Dahlbäck 2000). Este factor permite que las moléculas de fibrinógeno soluble en sangre pasen a fibrina insoluble. Las moléculas de fibrina se entrecruzan y atrapan de forma específica a otras macromoléculas y células (por ejemplo plaquetas), generando una red denominada trombo o coágulo. Una vez formado el coágulo fibrina-plaqueta en el área de la lesión tisular, éste limita la pérdida de sangre y permite regenerar el tejido dañado (Osinaga 1999, Lopez & Macaya 2009).

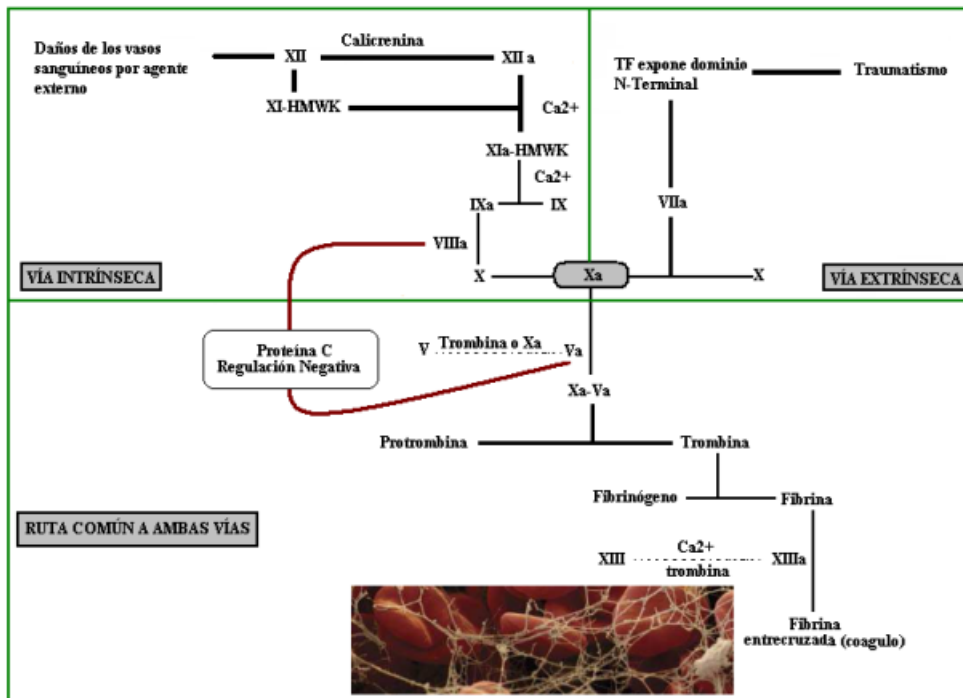


Figura 1. Representación esquemática de la cascada de la coagulación sanguínea. Vía intrínseca: el daño tisular activa al factor XII, este forma el complejo proteico denominado XIIa-HMWK y provoca la activación de la enzima calicrenina. Estas reacciones se dan en la cara interna del endotelio dañado y finalizan con la activación de Factor X. La vía extrínseca se desencadena principalmente por el factor tisular o Factor III el cual es una proteína transmembrana que al realizar un cambio conformacional interactúa con el factor VII y Ca^{2+} para formar un complejo ternario encargado de catalizar la formación de Factor X activado. El Factor X activado por cualquiera de las dos vías forma un complejo con Factor V activado que actúa sobre la protrombina circulante en plasma transformando a trombina. Esta actúa reclutando al Factor V activado y catalizando la formación de Fibrinógeno soluble a Fibrina insoluble. La formación del coágulo se da al atrapar células y hebras de fibrina entrelazadas. Líneas color negro, principales vías de conversión y activación factores de coagulación. Líneas color rojo, vías de regulación negativa del Factor V activado y VII activado por acción de la Proteína C. (Tomado y modificado de Osinaga 1999). La micrografía muestra la formación de una densa red de fibrina insoluble luego de dos minutos de producida la lesión en el tejido (tomada de Eye of Science/Photo Researchers).

1.3 Regulación de la cascada de coagulación y el sistema fibrinolítico

Debido a que las reacciones en la cascada de coagulación se aceleran de forma progresiva, éstas deben de modularse para evitar la formación exacerbada de coágulos. Si la inhibición de los factores de coagulación falla, pueden liberarse coágulos en el torrente sanguíneo que ocluyen las venas de menor calibre provocando un fenómeno que a nivel clínico se denomina trombosis venosa (TV) (Belloso 2000).

Existen tres grandes mecanismos de regulación de la cascada de coagulación (Ruiz 2009). Estos son:

- 1) Flujo sanguíneo: diluye los factores activados impidiendo la activación en cascada, en este sentido, la estasis venosa puede favorecer la formación de trombos.
- 2) Activación del sistema fibrinolítico. La fibrinólisis es el mecanismo por el cual se produce la lisis de la fibrina. Encargadas de atrapar células y formar el trombo como se describió anteriormente. Después de una serie de transformaciones de precursores inactivos (zimógenos) a enzimas activas en presencia de cofactores y sobre la superficie celular. Se convierte el plasminógeno en plasmina, la cual puede hidrolizar el trombo de fibrina solubilizándolo. En cada fase, una serie de proteasas inhibidoras limita estas reacciones y el hecho de que sucedan en la superficie celular, permite una regulación local, (Preissner 2008).

- 3) Activación de proteasas en sangre: estas clivan específicamente algunos factores de coagulación inactivándolos. Dentro de éstas se destaca la proteína C, que actúa inactivando los factores Va y VIIIa (Teijon & Garrido 2006). Estos procesos se detalla a continuación.

1.3.1 Inhibición de la cascada de coagulación.

La regulación de la cascada de coagulación tiene lugar a diferentes niveles y se lleva a cabo por enzimas inhibidores o por modulación de la actividad de los diferentes cofactores. Dentro de estos factores se desatacan el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) (Broze 1995). La antitrombina (AT), que actúa como inhibidor de la trombina y el FXa, pero también inhibe el FIXa, el FXIa y el FXIIa (Van Boven 1997). El sistema anticoagulante de la proteína C (PC) regula la coagulación mediante la modulación de la actividad de dos cofactores: el FVIIIa y el FVa (Dahlbäck 1995). La PC es una enzima tipo serin-proteasa, vitamina-K dependiente. Esta se activa sobre la superficie de células endoteliales mediante el complejo formado por la trombina y la trombomodulina (Lijnen 1995). La PCa junto con la proteína S (PS) libre forman un complejo unido a la membrana, el cual hidroliza los FVa y FVIIIa (Rezaie 2003).

2- Introducción a las enfermedades trombofílicas

La predisposición a formar coágulos venosos, es decir, la ocupación de la luz venosa por un trombo se denomina trombofilia (Lane *et al.*, 1996). Más del 90% de estos eventos trombóticos, tiene lugar en el sistema venoso profundo (SVP). Particularmente en las extremidades inferiores, de donde proviene el término trombosis venosa profunda (TVP) (Merino *et al.* 2008). El tromboembolismo pulmonar (TEP) y la pérdida de embarazos recurrentes son las principales manifestaciones clínicas de la trombosis venosa (Otero *et al.*, 2004). La TVP puede generar síntomas agudos como obstrucción de flujo sanguíneo; inclusive a largo plazo puede producir lesiones en las válvulas venosas, en las extremidades inferiores, este fenómeno se denomina síndrome postflebítico (Belloso 2000). La trombofilia puede causar, a nivel clínico, abortos espontáneos en el caso de mujeres embarazadas y fallas en la implantación del embrión en el caso de mujeres bajo tratamiento de fertilización. Esto se debe a que la trombosis interfiere en el desarrollo del sistema útero placentario (Glueck *et al.*, 2000; Otero *et al.*, 2004, Otero 2006).

Estudios realizados por Lens y colaboradores en la población uruguaya, determinan que las enfermedades tromboembólicas presentan una alta incidencia, 1 de cada 1.000 personas. La mortalidad se asocia principalmente a tromboembolismo pulmonar (Lens *et al.* 2000) y a abortos espontáneos (Napoles *et al.* 2012). En este escenario la medicina preventiva toma relevancia debido a la importancia de identificar a los pacientes con riesgo de trombosis e implementar así un tratamiento profiláctico.

Los factores de riesgo aumentan la probabilidad de desencadenar la enfermedad. Los asociados a la TVP son: estasis venosa, edad del individuo, embarazo, síndrome de Kippler-Trenauny, eventos tromboticos previos e historia familiar de TVP (Rossendaal 1999). El estudio de los polimorfismos o SNPs asociados con problemas en los factores de coagulación, se reserva para individuos menores de 45 años que hayan experimentado trombosis venosa o embolismo pulmonar, mujeres embarazadas con pérdida de embarazos recurrentes y a individuos con familiares portadores de dichas mutaciones (Belloso 2000, Napoles *et al.* 2012).

2.1 Bases moleculares de la trombofilia hereditaria

Debido a la gran diversidad de proteínas y genes asociados a la cascada de coagulación, son múltiples las mutaciones en estos genes que tienen consecuencias directas en la trombofilia. Los factores genéticos asociados con trombofilias son: A) déficit de antitrombina (Egeberg 1965, Patnaik 2008); B) resistencia a la inactivación del FVa causada por la mutación de Leiden (Bertina *et al.* 1994); C) déficit en la proteína C (Hoshi *et al.* 2007). D) mutación puntual en el gen de Factor II o protrombina (Turan *et al.* 2013); E) déficit en la proteína S (Svensson y Dahlback 1994). En la Tabla 1 se resumen los principales marcadores genéticos asociados a la trombofilia hereditaria y sus frecuencias a nivel poblacional

Tabla 1. Prevalencia de los principales factores de riesgos genéticos asociados a la trombofilia hereditaria. (Soria 2009)

Factor de riesgo	Frecuencia en la población en general %	Frecuencia en pacientes con trombofilia %
Déficits de AT	0.02	1 a 3
Déficit de PC	0.1 a 0.5	3 a 5
Déficits de PS	0.03 a 0.13	0.5 a 8
Factor V mutación G1691A	1 a 15	10 a 50
Factor II mutación G20210A	2 a 6	6 a 18
Homocisteinemia	Sin datos	Sin datos

2.2 Factor V de la coagulación sanguínea

El Factor V es una glicoproteína sintetizada en el hígado. En sangre circula como una cadena sencilla de 300 KDa. El gen de Factor V se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 (locus 1q23), tiene un tamaño aproximado de 80 kb y está compuesto por 25 exones y 24 intrones. La transcripción produce un ARNm de 6.8 kb y codifica una cadena polipeptídica de 2224 residuos aminoacídicos que incluye un péptido señal de 28 aminoácidos (Baulteler *et al.* 2005). Este es removido durante la translocación hacia el retículo endoplasmático. La proteína madura está compuesta por los dominios A1-A2-B-A3-C1 y C2 (Figura 2). A través de la activación proteolítica de la trombina, el dominio B se elimina y pasa a FVa. Este está formado por la cadena pesada A1-A2 y la liviana A3-C1-C2 las cuales permanecen unidas por enlaces no covalentes e iones de Ca^{2+} (Kalafatis *et al.* 1995).

El FVa actúa como cofactor de un complejo junto con FXa, fosfolípidos y Ca^{2+} que cataliza el pasaje de protrombina a trombina, ver Figura 1. Finalmente el FVa es inactivado por acción proteolítica de PCa, ver Figura 2. Esta reacción es más eficiente en presencia de fosfolípidos y Ca^{2+} . FVa se inactiva al romper la unión Arg506 y luego la Arg306 y Arg679 (Kalafatis *et al.* 1994).

2.2.1 Mutaciones puntuales en el gen del Factor V

La mutación de Leiden fue descrita por primera vez en 1994 por Bertina en la Universidad de Leiden, Holanda. Este polimorfismo genera la sustitución de Guanina por Adenina en la posición 1691 del gen FV y se anota como G1691A. El cambio de nucleótido genera en la proteína un reemplazo del aminoácido Arginina (R) en la posición 506 por Glutamina (Q) y se anota como R506Q o alelo Q506, (Bertina *et al* 1994).

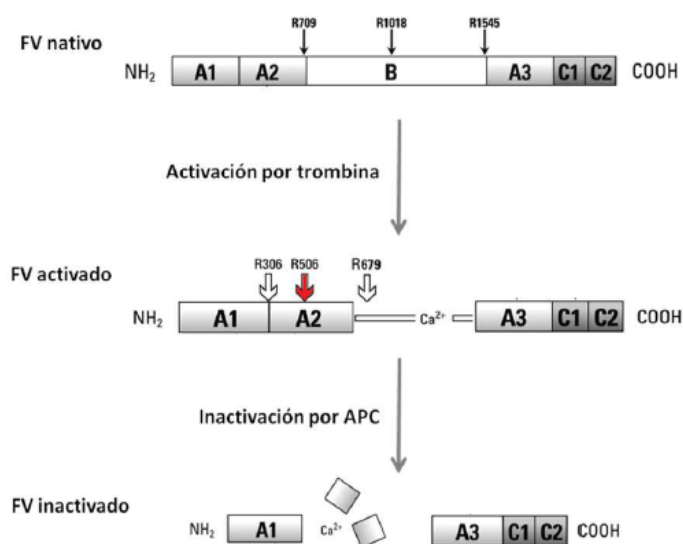


Figura 2. Esquema ilustrando los tres estados del Factor V. Estado nativo, activado e inactivado por acción de PCA. En rojo se indica el sitio del polimorfismo el cual genera un reemplazo del aminoácido R por Q evitando la escisión por acción de PCA y la correspondiente inactivación. (Tomado y modificado de Slavika L. et al. 2009)

Esta mutación impide la regulación por parte de PCA, como se detalla en la Figura 2, lo que genera un desbalance en la cascada de coagulación debido a la acumulación de FVa, generando una exacerbación de la coagulación (Slavik L. *et al.* 2009).

Desde el punto de vista clínico la mutación G1691A aumenta el riesgo de sufrir trombosis venosa en un factor mayor de 10 para individuos homocigotas mutados (G1691A/G1691A), mientras que para los individuos heterocigotas (G1691A/G1691) el riesgo de trombosis incrementa de 2 a 10 veces. Finalmente, quienes no presentan la mutación no se les asocian riesgos de trombosis por causas genéticas (College of American Pathologists, Surveys 2012).

La prevalencia de la mutación de Leiden es del 5% aproximadamente en las poblaciones de origen europeas occidental y prácticamente inexistentes en indígenas americanos, asiáticos y africanos. En países como Italia y España la prevalencia es del 4 %. Esta proporción es similar para la región sudamericana, 5.1% Buenos Aires, 3.1% Santiago de Chile y 2% San Pablo, (Lens *et al.* 2000).

2.3 Factor II de la coagulación sanguínea

El Factor II o Protrombina es una glicoproteína formada por dos cadenas polipeptídicas de 36 y 259 aminoácidos unidas por puentes disulfuro. La proteína activada (FIIa) o trombina es una serin-proteasa que actúa en la formación de FVa y XIIa. Junto con este último cataliza la formación de Fibrinógeno insoluble a partir de Fibrina soluble (ver Figura 1).

En 1996 Poort y colaboradores, publicaron una sustitución de una base nitrogenada de guanina por adenina en el nucleótido 20210 (G20210A). Esta se encuentra en la región no traducible en 3' del gen que codifica para FII (Poort *et al.* 1996). El polimorfismo se asocia al incremento de protrombina en plasma y al aumento en el riesgo de sufrir trombosis, siendo la segunda causa de origen genético después de la mutación de Leiden en generar complicaciones trombofílicas (College of American Pathologists, Surveys 2012). Cuando ambas mutaciones se encuentran en un mismo individuo la posibilidad de sufrir trombosis recurrentes es superior a los individuos sin mutaciones, e inclusive superior a la de aquellos con una sola mutación; (De Stefano *et al.* 1999)

Otros estudios asocian el uso de anticonceptivos orales y la presencia de la mutación con el incremento de eventos trombóticos. El riesgo aumenta con la presencia de la mutación en el gen FII asociada a la de Leiden (Martinelli *et al.* 2008; Emmerich *et al.* 2001)

La prevalencia de la mutación en el FII en la población caucásica es del 2% aproximadamente (Slavika L. *et al.* 2009). Los individuos que presentan la mutación de Leiden y la mutación G20210A, tienen como resultado un efecto multiplicador en la probabilidad de sufrir eventos trombofílicos (Miles *et al.* 2001). Estudios realizados en la población uruguaya indican un aumento de 2.8 veces en el riesgo de sufrir trombosis en presencia de dicho alelo (Lens *et al.* 2000).

2.4 La enzima Metilentetrahidrofoloreductasa

El gen que codifica para la enzima Metilentetrahidrofoloreductasa (MTHFR) se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1 en la región 1p36.3. Esta enzima cataliza la reducción del 5,10 Metilentetrahidrofolato a 5-Metiltetrahidrofolato (5-CH₃-THF), la fracción THF actúa como aceptor de carbonos. En las células una de las reacciones que requiere 5-CH₃-THF es la síntesis de Metionina a partir de Homocisteína (Matadamas *et al.* 2003).

2.4.1 Mutaciones puntuales en el gen de la enzima

Metilentetrahidrofoloreductasa

La sustitución de Citosina por Timina en la posición 677 (C677T) del gen que codifica para la enzima MTHFR, genera un remplazo de Alanina por Valina en el aminoácido 222 de la proteína. Esto deriva a nivel funcional en una versión termolábil de la enzima, y por tanto una menor actividad de MTHFR, como consecuencia se produce un aumento en los niveles séricos de Homocisteína en sangre. Esto se asocia a enfermedades cardiovasculares, complicaciones obstétricas y cáncer (Guiland *et al.*, 2003). Los individuos homocigotas para la mutación (C677T/C677T) presentan hiperhomocisteinemia y mayores riesgos de trombosis asociados a la falta de actividad de la enzima MTHFR, no siendo el caso para los individuos heterocigotas (C677T/WT) y normales (WT/W) (College of American Pathologists, Surveys 2012). En cuanto a la asociación entre el polimorfismo C677T y enfermedades trombofílicas no hay consenso científico. Algunos estudios de metaanálisis en diferentes poblaciones

asocian el SNP con pérdidas de embarazo recurrentes (Nair *et al.* 2012, Wu *et al.* 2012). Mientras que otros no encuentran relación estadísticamente significativa entre la mutación y trombosis recurrentes (Wiwanitkt 2005, Cao *et al.* 2013). Se ha descrito en la literatura un segundo polimorfismo genético en el gen que codifica para la enzima MTHFR denominado A1298C. Este SNP también disminuye la actividad de la enzima, pero su relación con enfermedades trombofílicas es aún menos clara (Madjunkova *et al.* 2012). Debido a que no hay demanda clara del personal médico por el estudio del SNP A1298C éste no será estudiado en el presente trabajo.

Desde el punto de vista técnico es posible diagnosticar la presencia o ausencia de SNPs en pacientes por tecnologías como secuenciación de ADN, Chips de Hibridación de ADN y PCR alelo específica entre otros. En este sentido algunos autores sostienen que la técnica de PCR en Tiempo Real con curvas de desnaturalización presenta ventajas frente a las demás técnicas dentro de las que se destacan su fácil uso, que es fácilmente automatizable y su rapidez (Patrinos *et al.* 2010). Por otro lado al realizar las reacciones en tubos cerrados es posible minimizar los eventos de contaminación cruzada con productos previamente amplificados. (Lo *et al.* 2010).

3- Antecedentes de la tecnología de PCR en Tiempo

Real

Desde que Higuchi y colaboradores en 1992 reportaron por primera vez la técnica de PCR en Tiempo Real, ésta fue rápidamente incorporada en laboratorios de investigación y clínicos. En el PCR en Tiempo Real, los procesos de amplificación y visualización se producen de manera simultánea en un único tubo cerrado, a diferencia del PCR convencional donde es necesario visualizar los productos amplificados en geles, comúnmente de agarosa o acrilamida (Bustin 2004). En el PCR en Tiempo Real no solo es posible cuantificar la cantidad de ADN o ARN a estudiar, sino que también se minimizan los tiempos asociados a la manipulación y de esta forma se minimizan costos y posibles contaminaciones. Ésta característica facilita a su vez los procesos de automatización y la capacidad de analizar un mayor número de muestras.(Dorak 2007). La técnica de PCR en Tiempo Real es utilizada en laboratorios de diagnóstico molecular por lo antes expuesto y por su alta sensibilidad y especificidad (Lo *et al.* 2010). Por esta razón actualmente aumentan las aplicaciones de la técnica en diferentes campos de diagnóstico molecular por ejemplo: oncología, genética médica, detección de agentes infecciosos y diagnóstico prenatal (Patrinós *et al.* 2010).

En cada ciclo del PCR en Tiempo Real es posible, detectar en cada tubo la amplificación del ADN de interés mediante la detección de fluorescencia generada por el uso de agentes intercalantes o sondas específicas. Finalmente, mediante el uso de un potente

software se realiza el análisis de los productos amplificados mediante curvas de desnaturalización, como se detalla más adelante.

Los agentes intercalantes como Syber Green, se unen fuertemente al surco menor de la hélice de ADN absorbiendo en la longitud de onda 497 nm y emitiendo en 525 nm. De esta forma el aumento de fluorescencia se debe al incremento del ADN amplificado. El uso de Syber Green se asocia a costos reducidos y fácil optimización del ensayo; como desventaja, en comparación con las sondas fluorescentes, no discrimina a nivel de secuencia los productos amplificados (Patrinos *et al.* 2010).

Existe una gran diversidad de sondas fluorescentes de ADN dentro de las que se destacan Taqman (o de hidrólisis), sondas Beacons, HyBeacons y sondas de hibridización. Todas se basan en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET por su sigla en inglés), entre 2 fluoróforos contiguos. En la actualidad hay proveedores especializados en sintetizar sondas de ADN con diferentes moléculas fluorescentes. En la figura 3 y 4 se resumen las principales sondas y sus mecanismos de acción utilizadas durante este trabajo.

3.1 Detección y clasificación de SNP por curvas de desnaturalización

La amplificación y discriminación alélica por curvas de desnaturalización o “melt” es una técnica simple y económica, combina una excelente especificidad y sensibilidad. Por este motivo esta técnica ha tenido gran aceptación en laboratorios clínicos (Erali *et. al*, 2008). La técnica consiste en someter a los productos amplificados en la reacción de PCR a un gradiente de temperatura, al tiempo que se registra la fluorescencia. Para realizar esta técnica se utilizan agentes intercalantes como Syber Green, o sondas fluorescente siendo las más comunes: FRET, Beacons, primers scorpions, y sondas HyBeacons (Dorak 2006, Erogetec 2012). Durante el aumento gradual de la temperatura el ADN se separa en simple hebra lo que genera un decaimiento de la fluorescencia. Los datos de la temperatura en función de la fluorescencia son luego analizados por un software, y visualizados de forma grafica como la derivada de la fluorescencia en función de la temperatura (df/dt) (Wittwer et al. 1997). Los puntos de inflexión son visualizados como máximos de fluorescencia en función de la temperatura ver Figura 13. Estos picos reflejan en el caso del uso de agentes intercalantes la temperatura del melting o T_m del producto amplificado, en la reacción de PCR correspondiente. A diferencia de las sondas fluorescente la T_m corresponde a la hibridación de esta en la hebra de ADN.

En el presente trabajo se utilizaron dos tecnologías de sondas fluorescente denominadas HyBeacons y sondas FRET, ver Figuras 3 y 4. En ambos casos el mecanismo de acción es el siguiente: inmediatamente después de realizar la amplificación de la región de ADN conteniendo el SNP, se realiza una curva de desnaturalización gradual al aumentar la

temperatura y monitorear la fluorescencia para luego analizar los datos en la función df/dt . La temperatura de melting obtenida depende del contenido en bases GC, del largo y de la secuencia donde hibridan las sondas fluorescentes (Kennedy *et al.* 2011). Por lo que la presencia de al menos un solo desajuste (mismatch o burbuja), de bases entre la hebra amplificada y la sonda fluorescente, es suficiente para generar diferencias en la temperatura de melting. En última instancia la presencia de un SNP en la zona de hibridación de la sonda genera variación en la temperatura de melting, lo que permite asociar la T_m con los correspondientes genotipos.

A continuación se comentan las principales características de las plataformas de PCR en tiempo real debido que la elección de la química de reacción para genotipar la presencia de SNPs depende de las características técnicas de las plataformas utilizadas.

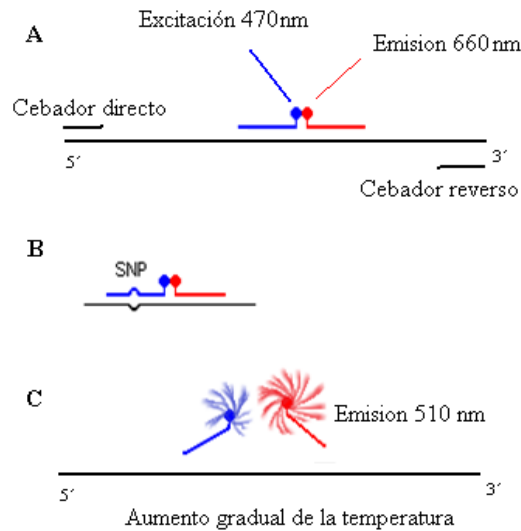


Figura 3. Esquema del mecanismo de funcionamiento para las sondas FRET. En negro región amplificada por PCR. En azul sonda FRET que presenta en el extremo 3' el fluoroforo reportero 6-carboxyfluorescein (FAM). En rojo sonda FRET que presenta en el extremo 5' un fluoroforo quencher (Cy5). A) Ambas sondas hibridan en la región amplificada. La excitación del fluoroforo FAM emite a 510 nm donde recepciona el fluoroforo continuo Cy5 denominado efecto FRET. El resultado final es la emisión de luz a 660 nm. B) Ambas sondas hibridan en la región conteniendo el SNP, en este caso la presencia del SNP genera una “burbuja” por despareamiento de bases. C) Desnaturalización de las sondas por aumento de temperatura. Al separarse los fluoroforos se pierde el efecto FRET. La presencia o ausencia del SNP en este punto genera diferencia en la temperatura de despareamiento de la sonda lo que permite clasificar los genotipos.

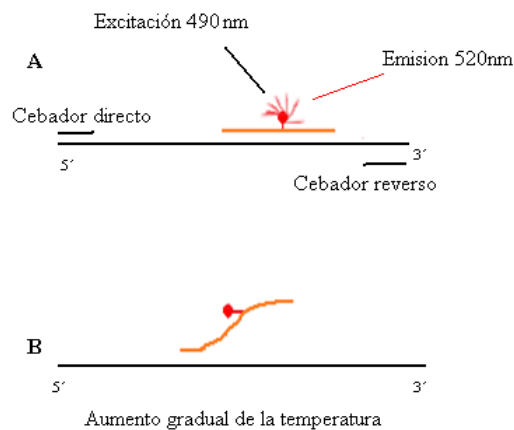


Figura 4. Esquema del mecanismo de funcionamiento de las sondas HyBeacons. En negro región amplificada por PCR, en naranja sonda HyBeacons. El fluoroforo 6-carboxyfluorescein (FAM) es interior a la sonda. A) Sonda hibridada en la región amplificada la que puede contener el SNP. El fluoroforo es excitado a 490 nm y emite luz a 520 nm cuando la sonda se encuentra completamente hibridada. B) Desnaturalización de las sondas por aumento gradual de la temperatura. La liberación de la sonda permite el movimiento del fluoroforo el cual se aproxima a la molécula de ADN actuando como aceptor de resonancia, teniendo como resultado que no haya emisión de fluorescencia. Si el SNP está presente generará una diferencia de temperatura la cual se utiliza para clasificar los genotipos.

3.2 Plataformas de PCR en Tiempo Real, tipos tendencias y compatibilidad

Podemos definir de forma genérica un instrumento de PCR en Tiempo Real como un termociclador, adosado a un sistema de emisión y detección de luz de diferentes longitudes de onda. En este, la recolección de los datos y análisis se da mediante un potente software. La ventaja de estas plataformas en comparación con las de punto final es que la amplificación y detección se realiza en un mismo paso y en tubos cerrados, pudiéndose determinar asimismo la concentración inicial de ADN y/o analizar la secuencia amplificada por ejemplo a través de curvas de desnaturalización o melting, (Dorak, 2006).

En la actualidad existen, en el mercado, diferentes plataformas con variadas características. La elección de la plataforma va a depender del uso y estrategia de cada laboratorio. Es importante destacar algunas características técnicas tales como: la capacidad para emitir y detectar a diferentes longitudes de onda (canales), el número de muestras máximo, la velocidad de termociclado, prestaciones y robustez del software, volumen de reacción, consumibles plásticos (disponibilidad y costos) y el servicio técnico. A continuación se detallan las principales características de las plataformas más comunes.

Desde su desarrollo por Higuchi en 1992, y comercialización en 1996 por Applied Biosystems, la tecnología de PCR en Tiempo Real ha evolucionado en tres diferentes

aspectos. La primera fue el desarrollo de una nueva química de fluorescencia o detección, ya que en un principio la técnica se basaba en una sola molécula capaz de detectar los productos amplificados durante la reacción con 9-FAM o SYBR Green I (máxima absorción de 594 nm, mínima emisión de 518nm). La aparición de nuevas moléculas fluorescentes fue acompañada con un aumento del número de canales de detección de las mismas en las plataformas, lo que permitió el desarrollo de reacciones de tipo multiplex donde se pueden detectar varios productos de amplificación en una sola reacción de PCR; es posible detectar hasta 6 productos (Bustin 2004)

La segunda característica desarrollada fue la rapidez. Las plataformas Rotorgene (Corbett) y Lightcycler (Roche) fueron las primeras en calentar y enfriar los tubos por aire acortando los tiempos en comparación con el termobloque tipo Peltier. Como desventaja estas plataformas no permiten analizar más de 72 muestras por ciclado a diferencia de las plataformas por Peltier que permiten de 96 a 384. Esta fue la última característica que desarrollaron los fabricantes de plataformas: la posibilidad de incrementar el número de muestras hasta 384 por ensayo, ver Tablas 2 y 3. Actualmente algunos fabricantes han desarrollado la transportabilidad de las plataformas. Esta se limita a los casos donde no es necesario la purificación y concentración de moléculas de ADN, (Dorak, 2006). Estas características, sumadas a las capacidades robóticas en el manejo de líquidos, permiten al PCR en Tiempo Real alcanzar un nivel de automatización y manejo de una gran cantidad de muestras siendo aplicable en diferentes laboratorios de análisis clínicos, de investigación e industriales (Bustin, 2004).

Tabla 2. Comparación técnica de las plataformas PCR en tiempo real más comunes en el mercado (tomado y modificado de Dorak (2006)).

Prestaciones	ABI 7500	ABI 7900	Bio Rad iQ5	Cehied SmartCycler	Corbett Rotro Gene	Eppendorf MasterCycler realplex	Roche LightCycler 480	Stratagene MX3005p
Fuente de luz	Lampara de halogeno-tungsteno	Láser de Argón	Lampara de halogeno-tungsteno	4 LEDs	4 LEDs	96 LEDs	Lampara de Xenon	Lampara de halogeno-tungsteno
Detector	Camara CCD	Camara CCD	Camara CCD	4 fotodetectores	4 PMTs	2 PMTs	Camara CCD	PMT
Sistema de escaneo	Toda la placa	Por fila	Toda la placa	Por pocillos	Por tubo	96 cables de fibraoptica	Sin dato	Toda la placa
Longitud de onda de excitación (nm)	450-650	488	400-700	450-650	470-625	470	450-615	350-635
Longitud de onda de emisión (nm)	500-700	500-660	400-700	500-650	510-665	520-605	500-670	440-610
Numero de muestras máxima por ciclado	Placas de 96 pocillos	Placas de 96 o 384 pocillos	Placas de 96 pocillos	16 pocillos independientes	Rotor de 36 a 72	Placas de 96 pocillos	Placas de 96 o 384 pocillos	Placas de 96 pocillos
Volumen de reacción (µl)	20-100	20-100 (96) 5-20 (384)	10 – 50	25 y 100	20-200	10 – 50	20-100 (96) 5-20 (384)	25
Sistema de control de temperatura	Peltier	Peltier	Peltier	Cerámica y aire	Aire	Peltier	Peltier	Peltier modificado
Sensibilidad	9 log.	9 log.	6 log.	Sin dato	12 log.	9 log.	8 log	10 log.

Tabla 3. Compatibilidad de las sondas y plataformas de PCR en Tiempo Real √ = Compatibles X = Incompatibles. (tomado y modificado de Dorak (2006)).

Plataforma/Tecnología de detección	Syber Green	Sondas Beacons	Sondas Hybeacons	Sondas FRET	Sondas Taqman
ABI 7500	√	√	√	x	√
ABI 7900	√	√	√	x	√
Bio Rad iQ5	√	√	√	√	√
Cehied SmartCycler	√	√	√	√	√
Corbett Rotro Gene	√	√	√	√	√
Eppendorf MasterCycler realplex	√	√	√	√	√
Roche LightCycler 480	√	√	√	√	√
Stratagene MX3005p	√	√	√	√	√
Techne Quantica	√	√	√	√	√

4-ANTECEDENTES DE LA EMPRESA

La empresa ATGen, fue fundada en el año 2001 por cuatro investigadores provenientes del ámbito académico y constituye el primer emprendimiento de incubación de empresas de biotecnología en la Universidad de la República. Ha actuado inicialmente en el marco de un convenio de investigación y desarrollo con la Universidad de la República, pasando en 2002 al ámbito privado, con el apoyo del Programa de Desarrollo Tecnológico financiado por el BID.

En 2003 recibió el Primer Premio en biotecnología, Millenium 21, en 2004 el Primer Premio a la PyME Innovadora de Red ProPyMEs y también el Premio a Iniciativas Biotecnológicas en Uruguay concedido por la Red AMSUD–Pasteur y en el mismo año el Cuarto Premio a Iniciativas Biotecnológicas Regionales de la misma Red. ATGen es una empresa de biotecnología con foco en la biología molecular y el diagnóstico clínico. La empresa diseña, desarrolla y produce kits de diagnóstico clínico basados en tecnologías de Biología Molecular bajo normas de buenas prácticas de manufactura (GMP) Mercosur (ordenanza 451/997). A su vez, brinda servicios especializados en medicina molecular para terceros donde se destacan la detección y cuantificación de virus (HIV, HCV, herpes virus, HPV), desordenes genéticos (X-Frágil, CYP 2C9, Proteína G, PPAR, APO E, H63D, C282Y, ECA) y oncogenes (ABL-BCR, Jak2). Cabe destacar que la gestión de estas actividades se realizan bajo normas de calidad ISO 9001:2008.

4.1 Oportunidad de desarrollo tecnológico

Por lo antes expuesto hay una demanda clara de parte del personal médico para detectar los SNP mencionados. Es el caso de mujeres embarazadas con pérdidas de embarazos recurrentes, pacientes con familias portadoras de alguna de las mutaciones y pacientes jóvenes con eventos trombóticos. Debido a las complicaciones obstétricas que pueden generar eventos trombóticos en mujeres embarazadas, algunos profesionales recomiendan realizar screening en población de riesgo (Dahm *et al.* 2012, Napones *et al.* 2012, Otero 2006).

Los servicios realizados en nuestro laboratorio para la detección de estos SNP (G1691A, G20210A y C677T) han aumentado a tasa de 55 % anual desde el año 2009. El desarrollo de una nueva tecnología rápida robusta económica y de fácil automatización presenta ventajas comparativas con otras tecnologías tales como PCR seguida de digestión con enzimas de restricción (RFLP) o PCR alelo específica.

La detección de SNP en laboratorios especializados es utilizada de forma rutinaria y la oferta de kits comerciales por parte de empresas internacionales a aumento, por lo que, se presenta una demanda clara en la generación de tecnología capaz de detectar SNPs bajo formato de kits.

II-OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

Desarrollar, validar y registrar ante el Ministerio de Salud Pública (MSP) un sistema de diagnóstico molecular en formato de kit comercial, para la detección de las mutaciones puntuales, G1691A, G20210A y C677T, en los genes que codifican FV, FII y MTHFR, respectivamente, utilizando la tecnología de PCR en Tiempo Real.

2.2 Objetivos específicos

1. Evaluar y elegir el sistema de extracción y purificación de ADN genómico más adecuado para la realización del ensayo de PCR en Tiempo Real a partir de muestras clínicas de sangre entera.

2. Diseñar un ensayo y optimización de las condiciones de PCR, para amplificar ADN genómico y clasificación de los SNPs correspondiente a los genes:

- FV de *Homo sapiens* cromosoma 1 (NT_009237.17) – SNP: mutación G1691A
- FII de *Homo sapiens*, cromosoma 11 (NT_004487) – SNP: mutación G20210A
- MTHFR de *Homo sapiens*, cromosoma 1 (NT_021937.18) – SNP: mutación C677T

3. Evaluar la sensibilidad y especificidad de diagnóstico para cada técnica.

4. Comparar la exactitud de diagnóstico con los resultados obtenidos con la técnica PCR RFLP.

5. Determinación de condiciones de almacenamiento y tiempos de estabilidad para cada kit.

III- MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estudio de molde para la reacción de PCR en Tiempo Real

Muestras de 3 ml de sangre humana fueron colectadas en tubos conteniendo 5,4 mg de EDTA como anticoagulante, y remitidas desde otros laboratorios. Todas las muestras clínicas utilizadas en este trabajo carecen de datos que permitan identificar al paciente.

Además de las muestras clínicas, se utilizaron muestras de ADN proveniente de programas de calidad nacionales: Comité de Estandarización y Control de Calidad (CECC, www.ceccuruguay.edu.uy/) e internacionales: College of American Pathologists (CAP, www.cap.org).

Durante la realización de este trabajo se tomaron precauciones para evitar contaminación con productos de amplificación previos, dentro de las que se destacan: separación del laboratorio por esclusas en áreas de pre-amplificación (donde se trabaja en la extracción de ácidos nucleicos y preparación de las reacciones) y post-amplificación por PCR (donde se realiza reacción de PCR y posterior electroforesis). Se destaca la separación de pipetas y vestimenta diferencial para cada área, así como la utilización de tips con filtro. En la Figura 5 se describe las principales áreas del laboratorio.

2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico a partir de sangre entera con EDTA se ensayaron y compararon 2 protocolos diferentes. Con el objetivo de evaluar las soluciones de ADN obtenidas en cada protocolo se determinó el: rendimiento en la extracción de ADN pureza y estabilidad de la solución de ADN almacenado. A continuación se describen dichos protocolos.

Protocolo 1.

Extracción de ADN a partir de sangre periférica. Este protocolo está basado en la lisis osmótica diferencial de células y posterior precipitación alcohólica del ADN genómico.

1. En tubo de 1,5 ml agregar 800 μ l de solución A (Sacarosa 0.3 M, Tris-HCl pH=8.0 10mM, MgCl₂ 10mM, TritónX100 1%, Azida de Sodio 10mM)

2. Invertir lentamente la muestra de sangre hasta que esté completamente homogénea y agregar 500 μ l de sangre al tubo que contiene la solución A.

3. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente para lisar los glóbulos rojos. Centrifugar 1 minuto a 5.000 rpm a temperatura ambiente.

4. Descartar el sobrenadante. Repetir los pasos 1 a 3 hasta lograr un precipitado blanco, (al menos 3 veces).

5. Resuspender las células en 200 μ l de solución B (Tiocianato de guanidina 2M, Igepal 0,25%, TrisHCl pH 8.0 10mM, EDTA pH 8.0 1mM, Azida de Sodio 2mM). Invertir el tubo 10 veces.

6. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente para lisar las células blancas. Si luego de la incubación se observan grumos, incubar a 37°C hasta que desaparezcan.

7. Centrifugar 2 minutos a 10.000 rpm y recuperar el sobrenadante en otro tubo de 1,5 ml.

8. Agregar al sobrenadante un volumen de etanol 95%. Invertir el tubo 20 veces. Incubar el tubo 5 minutos a temperatura ambiente.

9. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos. Descartar el sobrenadante.

10. Lavar el precipitado con 1 ml de etanol 70%. Centrifugar 2 minutos a máxima velocidad. Descartar todo el sobrenadante y dejar secar 10 minutos a temperatura ambiente.

11. Una vez seco, agregar 100 µl de buffer TE (Tris-HCl pH 8 10mM, EDTA 1mM). Para resuspender el ADN incubar 1 hora a 65°C o toda la noche a 4°C. Almacenar a -20°C.

Protocolo 2.

Extracción de ADN a partir de sangre periférica. Basado en la lisis celular y absorción del ADN en una membrana de sílice (Vogelstein & Gillespie, 1979; Boom *et al*, 1990; Colpan *et al*, 2002).

1. Colocar en tubo de 1,5 ml 20 µl de proteinasa K (20mg/ml) adicionar 200 µl de sangre y 200 µl de buffer de lisis. Incubar a 55 °C por 10 minutos

2. Adicionar 500 µl de etanol absoluto. Cargar todo el volumen en la columna.

3. Centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto. Descartar el material filtrado y lavar la columna dos veces con 500 µl de solución de lavado.

4. Adicionar 200 µl de buffer TE (Tris-HCl PH 8 10mM, EDTA 1mM). Centrifugar a 10.000 rpm por 1 minuto. Almacenar a -20°C.

3. Evaluación de la extracción de ADN genómico

Se utilizaron en total 10 muestras clínicas de sangre, cada una de estas se dividió en 2 y se aplicaron los protocolos 1 y 2. La solución de ADN obtenida de cada protocolo se estudió de la siguiente manera:

Rendimiento de la extracción; fue determinado utilizando 1 μ l de la solución conteniendo el ADN por espectrofotometría a 260 utilizando la plataforma NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). La pureza fue determinada mediante el cociente A260/A280 (aceptándose un coeficiente de 1,7-1,9) y A260/A230 (aceptándose un coeficiente de 1,8-2), para determinar la presencia de contaminantes.

La calidad de los ADN genómico fue evaluada por migración electroforética en gel de agarosa al 0,7% en buffer TBE (Tris-Borato 80 mM, EDTA 2 mM pH =8) durante 1 hora a 80 Volts. Para visualizar los ADN extraídos se utilizó una tinción con GelStar (Cambrex). Todos los gels de agarosa fueron visualizados en transiluminador UV (312 nm, Thermo Fisher Scientific, USA) y fotografiados con cámara digital convencional.

Para determinar la aptitud del ADN purificado como molde para la reacción de PCR, se amplificó la región perteneciente al gen ABL de 793 pb. Con cebadores (ABL2/1S, 5'-AGCATCTGACTTTGAGCC-3' y ABL3/4AS, 5'-CCCATTTGTGATTATAGCCTAAGAC-3'). Estos cebadores así como las condiciones de la PCR fueron descritos previamente por Watzinger & Lion (1998). Los resultados de estos

productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1% como se describe más adelante.

Por otro lado se evaluó la aptitud del ADN extraído como molde de PCR RT utilizando los mismos cebadores mencionados anteriormente (ABL2/1S y ABL 3/4AS) en la plataforma Rotor gene 3000 (Corbett). La amplificación fue monitoreada mediante SYBR Green I (Roche). En las Tablas 4 y 5 se detallan las condiciones utilizadas para la PCR en Tiempo Real.

Tabla 4. Composición de la mezcla de reacción de PCR en tiempo real. Para amplificar un fragmento de ADN 793 pb correspondiente al gen ABL.

Componente mezcla PCR RT	Fabricante	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen por reacción (µl)
STR 10x	ATGen	10x	1x	2
Taq 5 polimerasa	Biotools	5 U/µl	2,5 U/µl	0.5
Oligo ABL2/1S	IDT	10 µM	125 nM	0.25
Oligo ABL 3/4AS	IDT	10 µM	125 nM	0.25
SYBR Green I	Roche	10.000x	250x	0.5
Agua libre ADNasas/ARNasas	Applichem	-	-	14.5
Volumen Final (µl)				18

Tabla 5. Condiciones del termociclado del PCR RT, para la amplificación de una región del gen ABL. La excitación y detección de la emisión de la fluorescencia fue fijada en 470 nm y 510 nm respectivamente.

Etapa	nº ciclos	Tiempo	Temperatura (°C)	Detección de Fluorescencia
Desnaturalización	1	3 min.	95	no
Ciclado	35	30 seg.	94	no
		30 seg.	55	si
		30 seg.	72	no
Desnaturalización	1	1 min.	40	no
Melting	1	15 min	40 a 85	si (cada 1 grado)

4. Evaluación del efecto de la temperatura en el ADN genómico

Se tomaron 3 muestras clínicas de sangre y se les aplicó el protocolo 1 y 2. La solución de ADN obtenida para cada protocolo se almacenó en tubos de 1,5 ml con tapa de rosca a 4°C y -20°C por 18 meses. Transcurrido este tiempo se evaluó la calidad del ADN genómico (ADNg) por migración electroforética en gel de agarosa como se describió anteriormente.

5. Diseño de cebadores y sondas para PCR en Tiempo Real

La síntesis de todos los cebadores y sondas utilizados en este trabajo se realizó en Integrated DNA Technologies (IDT, USA).

Las propiedades de los cebadores como por ejemplo la formación de dímeros, loops y el contenido en bases GC, fueron determinadas por medio del programa Oligo analyzer 3.1 (disponible en www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/).

Se diseñaron varios juegos de cebadores y sondas para en una primera instancia amplificar la región deseada y luego clasificar por curvas de desnaturalización las correspondientes mutaciones. En el extremo 3' de las sondas se adicionan una molécula de fosfato de forma de evitar la extensión de la sonda en la reacción de PCR. Las secuencias de todos los cebadores y sondas utilizadas se detallan en la Tabla 6. La estructura molecular y propiedades de las moléculas utilizadas como fluoróforos en el presente trabajo se detallan en el Anexo 1.

Tabla 6. Secuencias de cebadores y sondas utilizadas en el presente trabajo. Se muestran los productos de amplificación que se obtienen con los cebadores en pares de base (pb) y el polimorfismo que detecta cada juego de cebadores y sondas. FAM corresponde al fluoróforo 6-Carboxyfluorescein (reporter), Cy5 corresponde al fluoróforo (quencher), IfluorT corresponde a la base modificada dT unida a Fam, /3Phos corresponde a una molécula de fosfato en el extremo 3'.

Imagen suprimida

6. Optimización del PCR en tiempo final

Los cebadores presentados en la Tabla 6 se evaluaron en una primera instancia por PCR de punto final, utilizando un gradiente de temperatura como se describe en la Tabla 7. Se valoraron diferentes temperaturas de hibridación para cada par de cebadores.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 μ l contenido 2,5 U Taq polimerasa (Biotools), 0,5 mM de cada cebador, KCl 0,5 M. Tris-HCl pH=9 0,1M, MgCl₂ 20mM, Tritón 1% y 2mM de cada dNTP. Todos los experimentos de PCR de tiempo final se realizaron en la plataforma Palm Cyclor (Corbett Research).

Tabla 7. Condiciones del termociclado en gradiente. Cada posición en el termociclador refiere a una temperatura.

Etapa	nº ciclos	Tiempo	Temperatura (°C)
1	1	3 min.	95
2	30	30 seg.	95
		30 seg.	*
		30 seg.	72
3	1	1 min.	4

Posición	Temperatura (°C)
1	53
2	55
3	57
4	58
5	60
6	61
7	63
8	64
9	66
10	67
11	70

A cada producto de PCR (20 µl) se le agregaron 4 µl de buffer de corrida 6X preparado según el procedimiento estándar, Sambroock & Russell (2001) y fueron migrados por electroforesis en gel de acrilamida al 6% en buffer TBE 1X (Tris-Borato 89 mM, EDTA 2mM pH=8) a 120 Volts por 30-40 minutos según Sambroock & Russell (2001). Los geles de acrilamida fueron revelados según un protocolo rápido de tinción con nitrato de plata previamente descrito, (Sanguinetti *et al.* 1994). Los geles fueron almacenados en bolsas plásticas de polipropileno transparentes hasta digitalizar la imagen en Scanner (Epson Perfection 1250).

La identidad de las secuencias de los productos de PCR de 170 pb para el gen FII, 165 pb para el gen FV y 296 para el gen FII fue obtenida por secuenciación automática, con los correspondientes cebadores directos, en equipo automático de 4 capilares, ABI3130 (Applied Biosystems) de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo.

7. Desarrollo y estandarización del ensayo PCR en Tiempo Real

Luego de realizar los ensayos de PCR punto final, se optó por una temperatura en donde los cebadores descritos anteriormente hibridan correctamente. Todos los ensayos de PCR en tiempo real se realizaron en la plataforma Rotor Gene 3000 (Corbett Research).

Se utilizó una estrategia de 4 etapas: a) desnaturalización y activación de la hotstart polimerasa, b) ciclado para la amplificación de la región blanco para cada mutación, c) estabilización y homogeneización de la temperatura y d) desnaturalización de los productos amplificados. Se aumenta la temperatura y se detecta fluorescencia cada 1 °C (ver Tabla 8).

Tabla 8. Condiciones del termocilado del PCR en tiempo real. (*) 62°C para la mutación G1691A en el gen FV y 64°C para la mutaciones C677T y G20210A en los genes Methilentetrahidrofolato reductasa y FII respectivamente. La excitación y detección de la emisión de la fluorescencia fue fijada en 470 nm y 660 nm respectivamente.

Etapa	nº ciclos	Tiempo	Temperatura (°C)	Detección de Fluorescencia
Desnaturalización	1	3 min.	95	no
Ciclado	30	30 seg.	95	no
		30 seg.	62/64 (*)	si
		30 seg.	72	no
Desnaturalización	1	1 min.	4	no
Melt	1	15 min	45 a 80	si (cada 1 grado)

Se ensayaron diferentes concentraciones de cebadores, como se muestra en la tabla 9, y la concentración de las correspondientes sondas para cada mutación se fijó en 0,25 µM.

Tabla 9. Concentraciones finales de los cebadores utilizados para optimizar cada reacción de PCR en Tiempo Real asimétrica.

Cebador Reverso (µM)	Cebador Directo (µM)		
	1.0	0.75	0.5
0.15	1,0/0,15	0,75/0,15	0,5/0,15

Cada una de las tres mezclas de reacción desarrolladas incorpora todos los componentes necesarios para amplificar y clasificar las correspondientes mutaciones (ver Tabla 10 para la mutación G1619A en el gen FV, 11 para la mutación G20210A en el gen FII y 11 para la mutación C677A en el gen Metilentetrahidrofolato reductasa). El buffer STR 10x se compone de los siguientes elementos: KCl 0,5 M, Tris-HCl 0,1M PH9, MgCl₂ 20mM, Tritón 1%, dNTP 2mM de cada uno.

Tabla 10. Composición de la mezcla de reacción de PCR en tiempo real. Utilizada para detectar la mutación G1619A en el gen FV.

Componente (Mezcla FV)	Fabricante	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen por reacción (µl)
STR 10x	ATGen	10x	1x	2
Taq 5 polimerasa	Biotools	5 U/µl	2,5 U/µl	0.5
Oligo FV RT F	IDT	10 µM	1,00 µM	2
Oligo FV RT Rev	IDT	10 µM	0,15 µM	0.3
Sonda A FV	IDT	10 µM	0,25 µM	0.5
Sonda B FV	IDT	10 µM	0,25 µM	0.5
Agua libre ADNasas/ARNasas	Applichem	-	-	12.2
Volumen Final (µl)				18

Tabla 11. Composición de la mezcla de reacción de PCR en tiempo real. Utilizada para detectar la mutación G20210A en el gen FII.

Componente (Mezcla FII)	Fabricante	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen por reacción (µl)
STR 10x	ATGen	10x	1x	2
Taq 5 polimerasa	Biotools	5 U/µl	2,5 U/µl	0.5
FII RT F	IDT	10 µM	0,13 µM	0.25
FII RT R	IDT	10 µM	1,00 µM	2
Sonda A FII	IDT	10 µM	0,25 µM	0.5
Sonda B FII	IDT	10 µM	0,25 µM	0.5
Agua libre ADNasa	Applichem	-	-	12.31
Volumen Final (µl)				18

Tabla 12. Composición de la mezcla de reacción de PCR en tiempo real. Utilizada para detectar la mutación C677A en el gen Metilentetrahidrofolato reductasa.

Componente Mezcla (Metil RT)	Fabricante	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen por reacción (µl)
STR 10x	ATGen	10x	1x	2
Taq 5 polimerasa	Biotools	5 U/µl	2,5 U/µl	0.5
Metil RT F	IDT	10 µM	0,50 µM	1
Metil RT R	IDT	10 µM	0,13 µM	0.25
Sonda A Metil	IDT	10 µM	0,50 µM	1
Sonda B Metil	IDT	10 µM	0,50 µM	1
Agua libre ADNAsas/	Applichem	-	-	12.25
Volumen Final (µl)				18

8. Integración de los componentes en kits

Para la confección del empaque o “packaging” de los kits, se contactaron diseñadores industriales. A los cuales se le plantearon los problemas asociados al empaque tales como: transporte, identificación de producto. Finalmente se evaluaron 2 propuestas, ver Anexo 4. Los kits fueron producidos bajo normas GMP y durante el presente trabajo los 3 kits fueron registrados ante el Ministerio de Salud Pública de Uruguay. Todos los reactivos de los kits se encuentran en solución y se comercializan en dos presentaciones: de 20 o 50 reacciones. Los kits desarrollados se detallan en las conclusiones.

9. Estudio de límite de detección para cada Kit

Se realizaron cinco diluciones seriadas de una solución de ADN humano cuantificado en Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) y de ADN de *E. coli* (cepa XL1). Todas las extracciones de ADN genómico se realizaron con el protocolo 2.

Se amplificaron por medio de los correspondientes kits con 2 µl de las distintas diluciones de ADN humano. Se determinó el límite de detección o también llamado límite de genotipo para cada mutación. El ADN de las correspondientes diluciones se cuantificó con la plataforma Nanodrop 1000.

10. Estudio de especificidad y sensibilidad de diagnóstico en muestras clínicas

10.1 Validación interna

Se realizaron ensayos de especificidad diagnóstica con muestras clínicas de sangre entera. En nuestro laboratorio se realizó la extracción de ADN por el protocolo 2 y la solución conteniendo ADN fue dividida en 2 muestras. Éstas fueron genotipadas (para cada SNP en estudio), una por medio de los kits desarrollados y la otra por la técnica de PCR RFLP. Para realizar la genotipificación con la técnica de PCR RFLP se utilizó un juego de cebadores y enzimas de restricción previamente publicados: Bertina *et al.* 1994, para la mutación G1691A, Poort *et al.* 1994 para la mutación G20210A y Matsuo *et al.* 2001 para la detección de la mutación C677A.

Se analizaron con los correspondientes kits, 250 muestras para la mutación G1691A (gen FV), 250 muestras para la mutación C677T (gen Metilentetrohidrofolato reductasa) y 250 muestras para la mutación G20210A (gen FII). Las muestras de sangre fueron independientes para cada mutación y corresponden a muestras de pacientes de riesgo de sufrir eventos tromboticos, enviadas al laboratorio por el personal médico.

10.2 Validación externa

Se realizó un control de calidad externo de los resultados mediante la participación en el programa internacional MGL1 (Molecular Genetics) del College of American Pathologists CAP (www.cap.org). En éste participan 390 laboratorios, la mayoría de los cuales se encuentran en EEUU y 80 se distribuyen en diferentes países como Argentina, México, Brasil, Uruguay, Canadá, Chile, China, Egipto, Francia, Alemania, Arabia Saudita, Sud África, Japón, Corea del Sur y Turquía entre otros. Los laboratorios participantes son previamente acreditados por parte del CAP para su ingreso en los programas de calidad y la participación implica 2 envíos anuales de 3 muestras (ADN) por año.

Por otro lado se participó en un programa similar al anterior pero de alcance nacional, denominado Comité de Estandarización y Control de Calidad (CECC, www.ceccuruguay.edu.uy/). A diferencia del CAP, el programa nacional envía muestras de sangre para su análisis. Los resultados fueron remitidos al laboratorio externo el cual devuelve un informe con los resultados por todos los laboratorios participantes.

11. Estudios de limitaciones e interferencias

Los kits fueron desarrollados para detectar y discriminar con alta especificidad los polimorfismos G20210A, C677T y G1691A. Para desafiar los kits frente a mutaciones en la zona de hibridación de las sondas que puedan interferir con la temperatura de melt se desarrollaron sondas complementarias a la región conteniendo el SNP de interés (ver Tabla 13).

El estudio de interferencia se realizó con los correspondientes kits, en un tubo de PCR se colocó 18 μ L de la correspondientes mezcla de reacción y 2 μ l del oligo complementario en exceso (100 μ M) a G1691G, A1692C, A1696G, G1689A para el kit Factor V (G1691A) Leiden Real Time (RG); A20218G, C20221T, C20209T para el kit Factor II (G20210A) Real Time (RG) y C677T, G679A para el kit MTHFR (C677T) Real Time (RG), ver Tabla 13.

Tabla 13. Secuencias complementarias a las sondas de hibridación. En color rojo mutaciones próximas a los polimorfismos G1691A, G20210A y C677T.

Tabla Suprimida

12. Estabilidad de los kits en función de la temperatura de almacenado

Bajo normas GMP se produjeron 4 lotes de los correspondientes kits, los cuales fueron almacenados a diferentes temperatura como se detalla en la Tabla 14. En cada ensayo se cuantificó la fluorescencia así como el aspecto general de todos los componentes del kit. Para cada ensayo se utilizó el instructivo y protocolo de uso de cada kit (ver Anexo 3).

Tabla 14. Se resumen las condiciones de almacenado y la frecuencia de cada ensayo para cuatro lotes de cada kit respectivamente.

Condiciones experimentales de almacenado			
Nombre	Temperatura (°C) de almacenado	Tiempo	Frecuencia de ensayo
Natural	-20	18 meses	Mensual
Acelerado	15 a 20	15 días	Diaria
Ciclos de descongelado	-20/15 a 20	15 días	Diaria

13. Análisis de costos para cada kit

Se realizó un análisis de costos para los kits desarrollados, contemplando los insumos necesarios en la producción de los kits. Para realizar las estimaciones de costos se utilizó el kit FV G1961A. Así como los costos del sistema de extracción de ADN tanto para el protocolo 1 como el 2. Por otro lado, se cuantificaron y compararon las horas asignadas a la técnica desarrollada con la de PCR RFLP.

14. Producción GMP y registro de los kits ante el MSP

Se realizaron 2 lotes de producción bajo normas GMP para cada kit, los cuales fueron registrados en el Departamento de Tecnología Médica, división productos de salud del Ministerio de Salud Pública. En la Figura 5 se detalla el plano del laboratorio con separación de áreas, requerido para evitar contaminaciones previas de los productos amplificados por PCR.

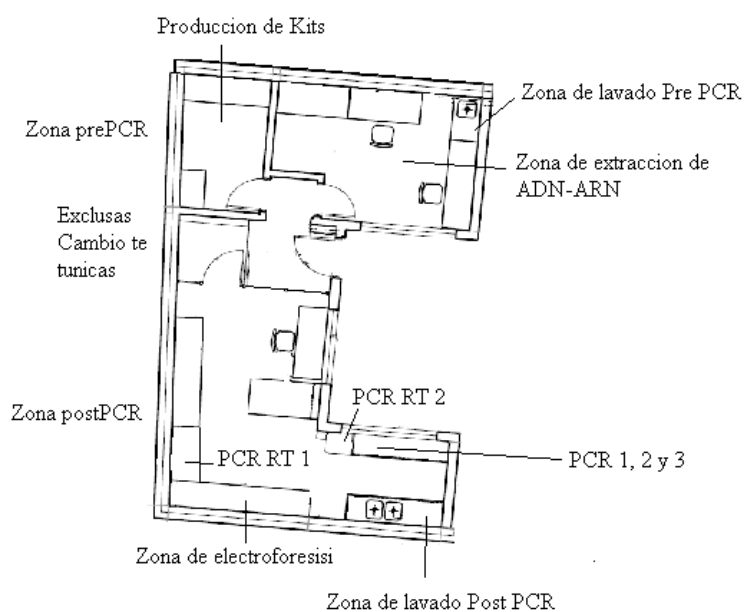


Figura 5. Plano del laboratorio utilizado se destacan la separación de áreas y material así como el flujo de materiales y vestimenta asociada en cada área.

IV- RESULTADOS y DISCUSIÓN

1. Extracción de ADN genómico

A partir de 10 muestras de sangre se purificó ADN_g por medio de dos protocolos diferentes (ver materiales y métodos): protocolo 1 (lisis celular y precipitación con alcohol) y protocolo 2 (lisis celular con absorción del material genético en membrana de sílice). Se determinó el rendimiento de ambos protocolos y la comparación de los mismos se detalla en la Tabla 15.

Tabla 15. Cuantificación por espectrofotometría de las soluciones, conteniendo ADN_g. Obtenidas aplicando el protocolo 1 (P1) y protocolo 2 (P2).

Muestra-Protocolo	Concentración	Absorbancia (nm)		Cociente	Muestra-Protocolo	Concentración	Absorbancia (nm)		Cociente
	ng/ul	260	280	260/280		ng/ul	260	280	260/280
ADN 1-P1	6.45	0.13	0.13	1.03	ADN 1-P2	24.60	0.49	0.23	2.14
ADN 2-P1	11.08	0.22	0.12	1.88	ADN 2-P2	44.90	0.46	0.46	1.00
ADN 3-P1	9.29	0.19	0.08	2.30	ADN 3-P2	18.65	0.37	0.17	2.25
ADN 4-P1	22.95	0.46	0.26	1.77	ADN 4-P2	11.17	0.22	0.22	1.01
ADN 5-P1	4.77	0.10	0.04	2.64	ADN 5-P2	24.07	0.48	0.23	2.08
ADN 6-P1	35.43	0.71	0.35	2.04	ADN 6-P2	27.90	0.56	0.25	2.20
ADN 7-P1	10.23	0.21	0.11	1.93	ADN 7-P2	16.55	0.33	0.15	2.15
ADN 8-P1	79.53	1.59	0.90	1.78	ADN 8-P2	22.21	0.44	0.22	2.04
ADN 9-P1	72.95	1.46	0.81	1.80	ADN 9-P2	23.86	0.48	0.23	2.06
ADN 10-P1	34.59	0.69	0.39	1.78	ADN 10-P2	26.17	0.52	0.26	2.04
Promedio	28.73				Promedio	24.01			
Desvío estándar	27.39				Desvío estándar	8.88			
Coficiente de variación	95.34				Coficiente de variación	36.97			

Si observamos el promedio de las concentraciones recuperadas, el protocolo 1 tiene valores levemente superiores, aunque mayor dispersión de datos. Debido a esto el coeficiente de variación es de 95% en el protocolo 1, frente a 36.9% para el protocolo 2. Con estos datos se concluye que el protocolo 2 produce soluciones de ADN_g más uniformes que el protocolo 1. Por otra parte es importante destacar que en el caso del protocolo 1, dada su gran variabilidad algunas muestras se aproximan al límite de detección establecido en la sección 6 pudiendo ocasionar

curvas de melting de difícil interpretación o valores de CT altos en la amplificación. Es importante destacar que la calidad del ADN_g recuperado, evaluada a partir de la relación 280/260, es considerada aceptable en ambos casos, ver Tabla 15.

La calidad del ADN_g obtenido por ambos protocolos fue analizada por la técnica electroforesis en gel de agarosa como se muestra en la Figura 6. En esta figura podemos observar que al aplicar el protocolo 2 se obtiene moléculas de ADN de tamaño similar y por ende se minimiza la fragmentación, en comparación a cuando aplicamos el protocolo 1. Resultados similares fueron previamente reportados por otros investigadores, Ausubel *et al.* 1995. El protocolo 1 produce la lisis celular por shock osmótico y genera un patrón heterogéneo en el tamaño de las moléculas de ADN, posiblemente como resultado de la actividad de nucleasas. Contrariamente, el protocolo 2 genera moléculas de ADN de tamaño uniforme siendo el óptimo para la purificación de las moléculas de ADN_g a partir de sangre entera con EDTA.

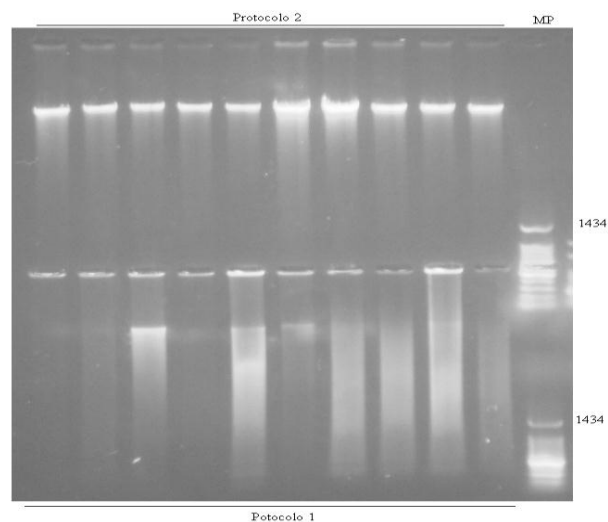


Figura 6. Gel de agarosa al 0,7% teñido con GelStar. Se visualizan 10 muestras de ADN genómico purificadas con el protocolo 1 (panel inferior) y protocolo 2 (panel superior). MP: marcador de peso molecular PBL. Se observa banda correspondiente a 1434 pb según fabricante.

También se determinó la calidad del ADN_g para ser utilizado como molde en la reacción de PCR, para esto se amplificó una región del gen humano (ABL) de 793 pb. En la figura 7 se

observa por medio de electroforesis en gel de acrilamida, los productos de PCR a partir de los ADN_g extraídos. Como era de esperar la reacción de PCR aplicada sobre los ADN_g obtenidos con en el protocolo 2 padecen bandas únicas más limpias que el protocolo 1. Si bien ambos moldes son aptos para aplicar la técnica de PCR en punto final, el protocolo 2 genera en la reacción de PCR menos productos inespecíficos y ruido que el protocolo 1.

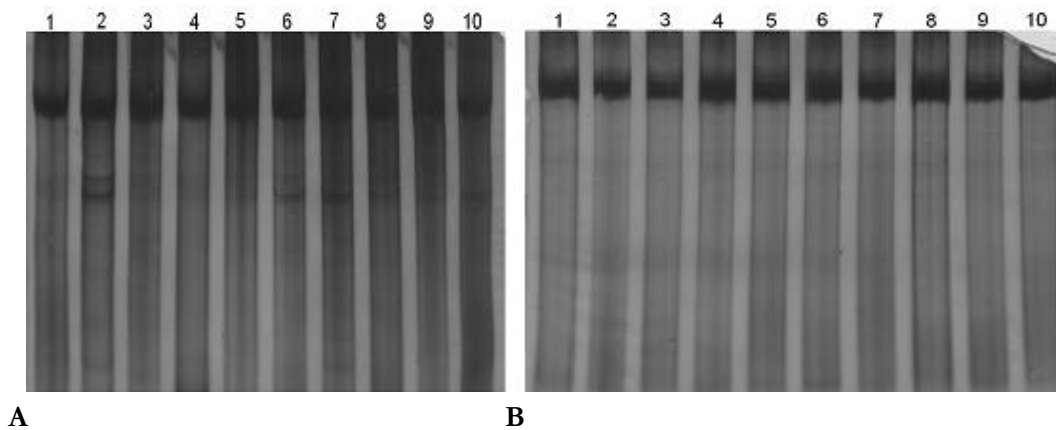


Figura 7. Gel de acrilamida al 6% teñido con nitrato de plata de las PCR de una región del gen ABL realizadas con los distintos ADN_g extraídos. A) PCR sobre ADN_g extraído utilizando el protocolo 1 y B) PCR sobre ADN_g extraído utilizando el protocolo 2. Se espera un amplicon de 793 pb.

Por otra parte, se evaluó la aptitud de las moléculas de ADN_g como molde para realizar reacciones de PCR en Tiempo Real mediante la amplificación de una región del gen humano de ABL de 793 pb ver Figura 8. Los resultados obtenidos para el PCR en punto final son concordantes con los obtenidos para el PCR en Tiempo Real, lo que sustenta con mayor fuerza la elección del protocolo 2 frente al 1 para la extracción de ADN_g. Debido a que este presenta uniformidad en la cantidad y calidad del ADN purificado según lo denota el PCR en punto final, Figura 7, PCR en Tiempo Real Figura 8 y la concentración y calidad de la molécula obtenida Tabla 15 y Figura 6. Debido a la dispersión de los valores de CTs en las 10 muestras obtenidas aplicando el protocolo 2, Figura 8. Es posible sospechar la presencia de moléculas que interfieran en la reacción de PCR, si bien no se realizaron estudios para determinar la presencia inhibidores,

por ejemplo realizando diluciones del ADN genómico extraído por cada protocolo, este fenómeno no se observa en las 10 muestras obtenidas aplicando el protocolo 1.

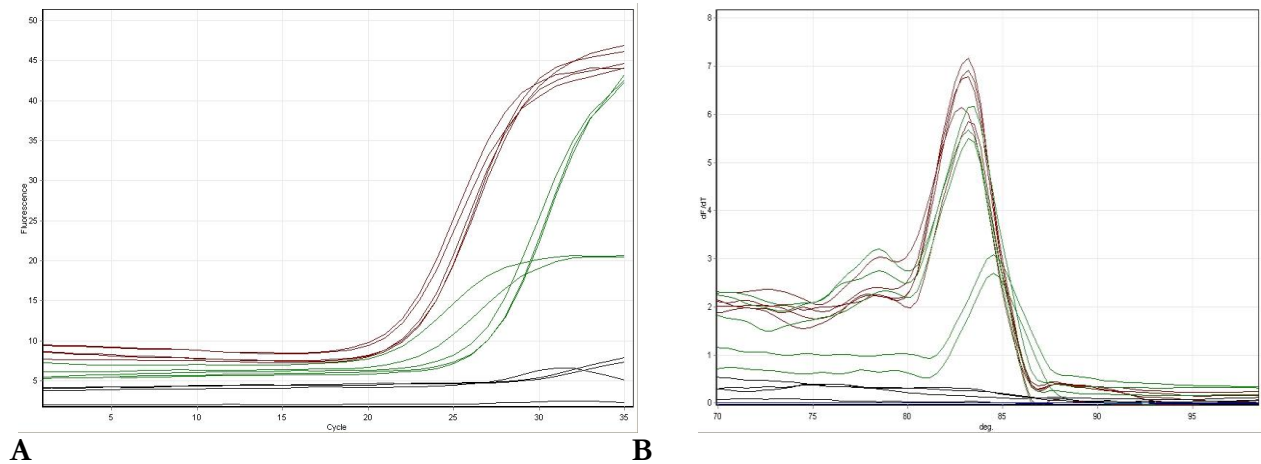


Figura 8. Amplificación por PCR y análisis por curva de desnaturalización de una región del gen ABL. En verde: muestras de ADN extraídas con el protocolo 1. En rojo: muestras de ADN extraídas con el protocolo 2. En A) se muestra la Fluorescencia en función de ciclos de amplificación y en B) la derivada de la fluorescencia en función de la temperatura.

2. Estudio de estabilidad del ADNg en diferentes temperaturas de almacenado

Se determinó la estabilidad del almacenamiento para el ADNg extraído con ambos protocolos de purificación. Se almacenaron tres muestras de ADNg a 4 °C y -20°C durante 18 meses con las cuales luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa para determinar la calidad del ADNg (ver Figura 9).

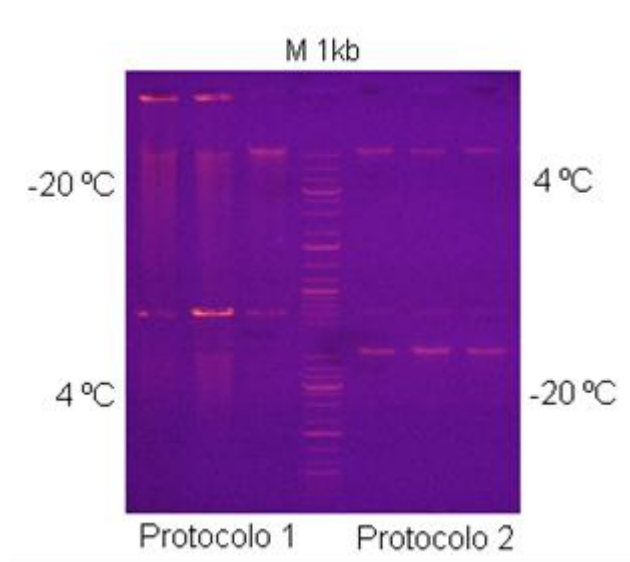


Figura 9. Gel de agarosa al 0,7% teñido con Bromuro de etidio. Se visualizan 3 muestras de ADN genómico purificadas con el protocolo 1 (panel izquierdo) y protocolo 2 (panel derecho). En los laterales se indica la temperatura de almacenado durante 18 meses. M: marcador de peso molecular PBL Gde 1Kb.

Con estos resultados es posible afirmar que la aplicación del protocolo 2, para la extracción de ADNg de muestras de sangre, produce una solución de ADNg de mayor calidad que el obtenido al aplicar el protocolo 1. Estos se sustentan en el hecho de que se observan bandas uniformes correspondientes al ADNg Figura 6, bandas únicas en PCR convencional Figura 7 y una valores similares en los CTs y picos de melt uniformes en PCR en Tiempo Real Figura 8, así como una mayor estabilidad a largo plazo a 4 °C y a -20°C, Figura 9. Debido a que el protocolo 1 no se utiliza una matriz que retenga el ADN es difícil estandarizar las diferentes muestras lo que dificulta la implementación de dicho protocolo en laboratorios de análisis clínicos e imposibilita la automatización y manejo de gran cantidad de muestras. Como ventaja esta técnica presenta un menor costo en comparación a la aplicación del protocolo 2, siendo unas 100 veces más económica.

Los kits desarrollados en el presente trabajo, no incorporan este sistema de extracción de ADN. A la luz de los resultados obtenidos se recomienda al usuario final la utilización de protocolo 2. Y es utilizado en nuestro laboratorio durante la producción del ADNg como control positivo del kit.

3. Optimización de la temperatura de hibridación en PCR tiempo final

Como se muestra en las Figuras 10, 11 y 12, la PCR en gradiente permite chequear diferentes temperaturas de hibridación, de los cebadores en un solo ensayo. Los resultados obtenidos en la PCR se visualizan en geles de acrilamida de forma de observan con mayor detalles los productos inespecíficos, estos serían difíciles de visualizar en geles de agarosa y en el PCR en Tiempo Real donde las sondas reportan solo la región amplificada complementarias a ellas.

En el presente ensayo, 11 temperaturas diferentes fueron evaluadas. De este modo es posible determinar la temperatura óptima de hibridación para cada par de cebadores, seleccionado aquellas temperaturas en las cuales se presenta una banda única, en ausencia de productos de PCR inespecíficos o ruido de fondo. Incluso, alguna de estas temperaturas es tan elevada que se pierde los productos amplificados de interés ver Figuras 10, 11 y 12.

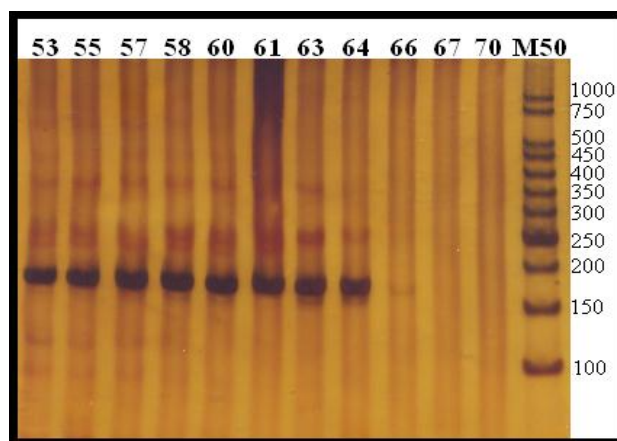


Figura 10. Gel de acrilamida al 6% teñido con nitrato de plata - Amplificación en gradiente de una región de 165 pb del gen FV. Cada carril indica una temperatura de annealing (en °C) específica. M50 carril marcador de pares de base, M50.

Como se muestra en la Figura 10, la temperatura de hibridación que presenta menor ruido de fondo es 64 °C, para el gen FV siendo el tamaño de amplificación de 165 Pb, como era de esperar. Temperaturas mayores como 66, 67 y 70 °C no muestran amplificación Figura 10, y por el contrario temperaturas menores a 64 °C muestran mayor presencia de bandas inespecíficas.

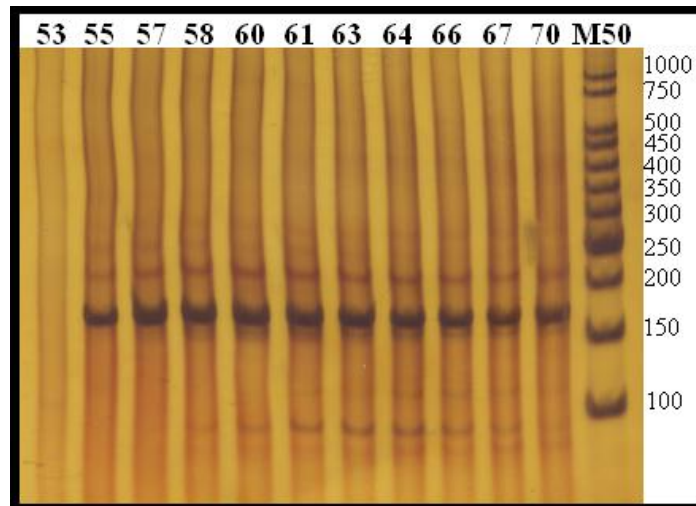


Figura 11. Gel de acrilamida al 6% teñido con nitrato de plata - Amplificación en gradiente de una región 170 pb del gen MTHFR. Cada carril indica una temperatura de annealing (en °C) específica. M50 carril marcador de pares de base, M50.

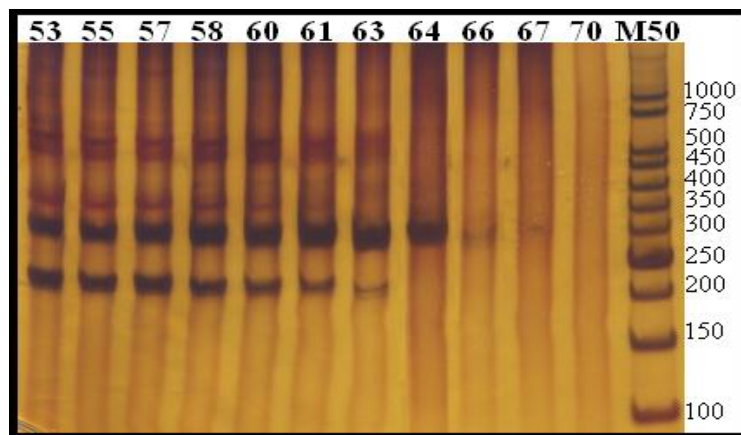


Figura 12. Gel de acrilamida al 6% teñido con nitrato de plata - Amplificación en gradiente de un fragmento de 296 pb del gen FII. Cada carril indica una temperatura de annealing (en °C) específica. M50 carril marcador de pares de base, M50.

A partir de estos resultados se pudo asignar la temperatura óptima de hibridación para cada juego de cebadores, en el PCR en punto final. Es decir 64°C para el par de cebadores utilizados en el gen FV, 70°C para el gen MTHFR, y 64 °C para los cebadores útiles en la amplificación del gen FII.

4. Estandarización del PCR en tiempo real

Se utilizaron dos tecnologías de sondas diferentes, de hibridación FRET y Hybeacon, para la amplificación y clasificación de genotipos por curvas de desnaturalización para la mutación G20210A en el gen FII. La secuencia de estas se presenta en la Tabla 6 y en el Anexo 1 las moléculas fluorescentes utilizadas. En la Figura 13 se presentan los resultados del genotipado de la mutación G20210A utilizando ambas tecnologías. Para el resto de las mutaciones estudiadas se utilizó la tecnología FRET.

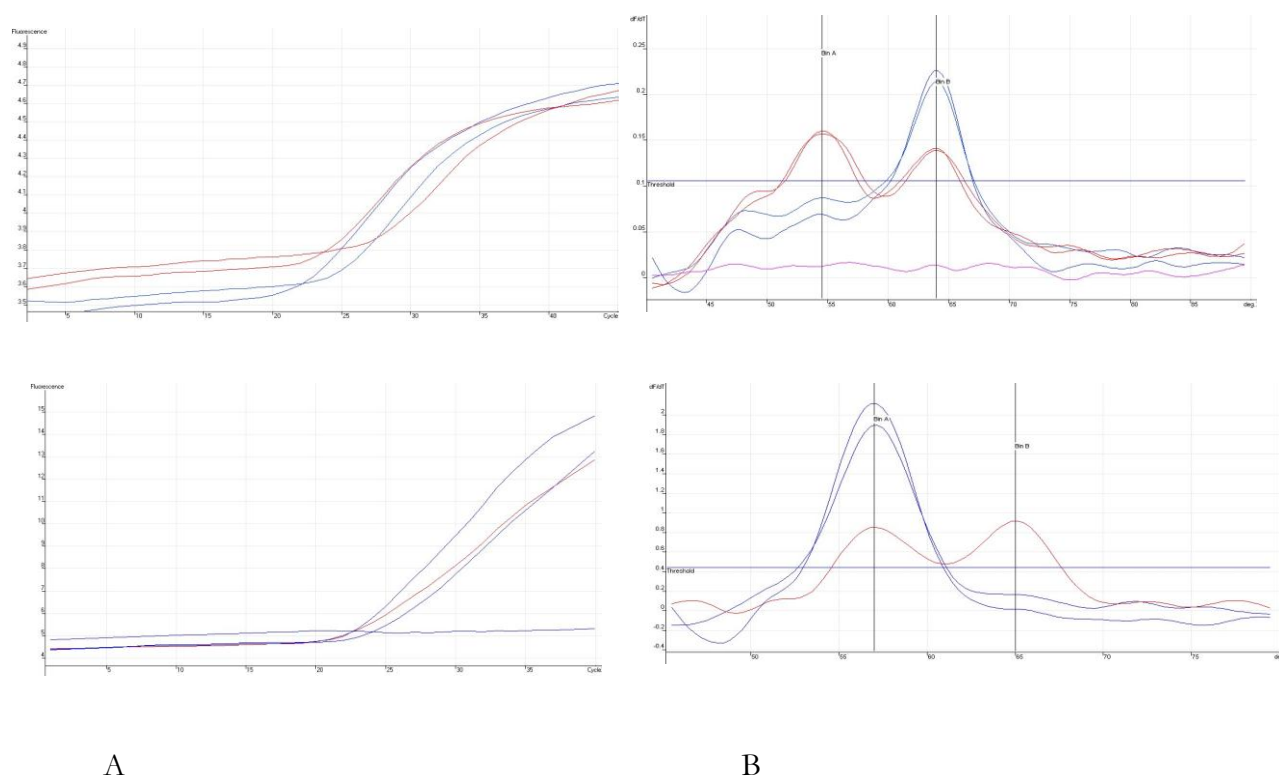


Figura 13. Fluorescencia en función de ciclos de PCR y posteriores curvas de desnaturalización para la mutación G20210A en el gen FII. A) Sondas FRET y B) Sondas Hybeacons.

A partir de estos resultados pudimos observar que ambas tecnologías son comparables y resuelven el genotipo deseado de forma robusta. La bibliografía indica que ambas tecnologías presentan ventajas técnicas a la hora de resolver los genotipos en comparación con otras tales como sondas de hidrólisis o Taqman y presentan un diseño más fácil en comparación con las sondas Beacons (Dorak

2007). Si bien ambos resultados son comparables se descarta las sondas HyBeacons debido a su mayor costo en comparación a las sondas FRET. Este aumento de costo se debe a que la tecnología HyBeacons tiene una o dos moléculas fluorescentes adjuntas a la timina modificada (dT) la cual se localiza en la región interna a la sonda, ver Figura 4 y Anexo 1.

Por otra parte, se realizó un PCR asimétrico para determinar la concentración óptima del cebador directo. De esta manera es posible sintetizar mayor cantidad de la hebra de ADN donde hibridan las sondas y resolver el genotipado, de las muestras de forma más robusta. Esto se sustenta en el hecho de que se genera más cantidad de una hebra que la complementaria, generando más molde para que la sonda hibride, lo que se observa claramente en el perfil de desnaturalización, ver Figura 14. Se ensayó la amplificación de 3 muestras, para resolver la mutación G1691A en el gen FV, donde se varía la concentración del cebador directo desde 1 a 0,5 μM , en la Tabla 9 se detallan las concentraciones de los cebadores.

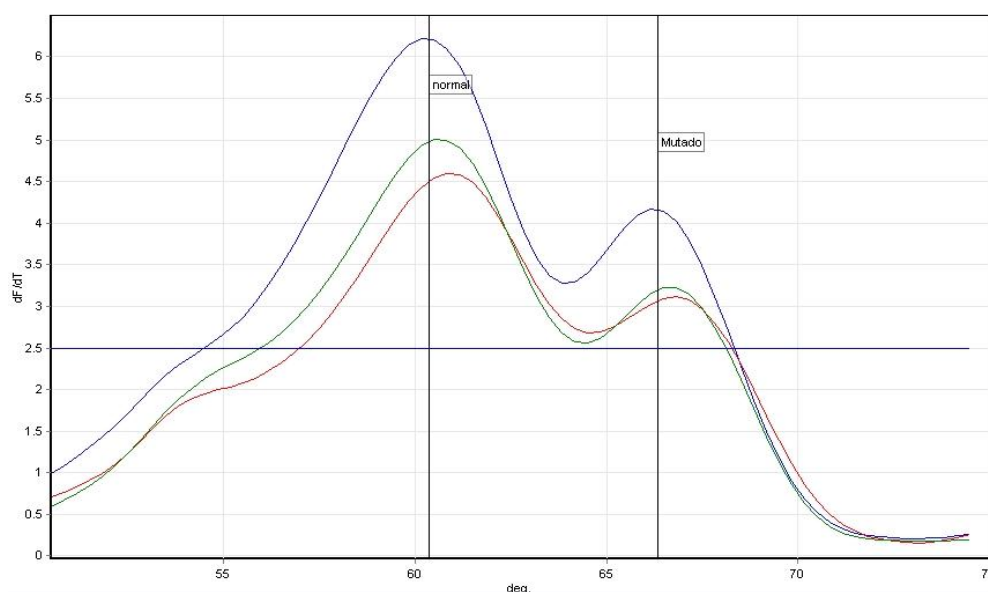


Figura 14. Se muestra la curva de desnaturalización o melt, para el gen FV (genotipo WT/G1691A). La muestra fue analizada por triplicado variándose la concentración final del cebador reverso: 1 μM (azul), 0,5 μM (rojo) y 0,75 μM (verde).

De las tres condiciones descritas pudimos determinar que es posible generar mayor cantidad de molde a una concentración final de primer reverso de 1 μ M. Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros investigadores (French *et al.* 2004). Los resultados obtenidos fueron extrapolados para la mutación del gen MTHFR y FII.

5. Diseño del producto final

Concluidos los estudios presentados, los sistemas desarrollados fueron llevados al formato de kit de diagnóstico. El formato de kit facilita su transporte, comercialización y producción aplicando normas GMP, ya que cada componente es evaluado según especificaciones de producto y loteado de forma de establecer una perfecta trazabilidad desde la materia prima hasta el producto final. Los kits incluyen el empaque (ver Figura 15), protocolos acompañantes donde se detallan las condiciones de uso y almacenaje de los kits, ver Anexo 2.

Por otro lado se realizaron los trámites y registro de productos ante el Ministerio de Salud Pública. Los mismos quedaron registrados de la siguiente manera: Reg. MSP 41955 para el kit Factor V Leiden Real Time (RG), Reg. MSP 45179 para el kit MTHFR (C677T) Real Time (RG) y Reg. MSP 45180 para el kit Factor II Real Time (RG)



Figura 15. Fotos de los kits desarrollados durante el trabajo. Los kits son identificados según su color. A la izquierda se muestra la caja del kit FII (RG) con su etiqueta identificadora y a la derecha la caja del kit MTHFR

Los kits desarrollados incluyen una mezcla de reacción que se identifica con un color. Ésta contiene todos los componentes incluidos en una solución buffer (cebadores, dNTPs Taq polimerasa), un control positivo (ADN heterocigota para la correspondiente mutación) y un control negativo.

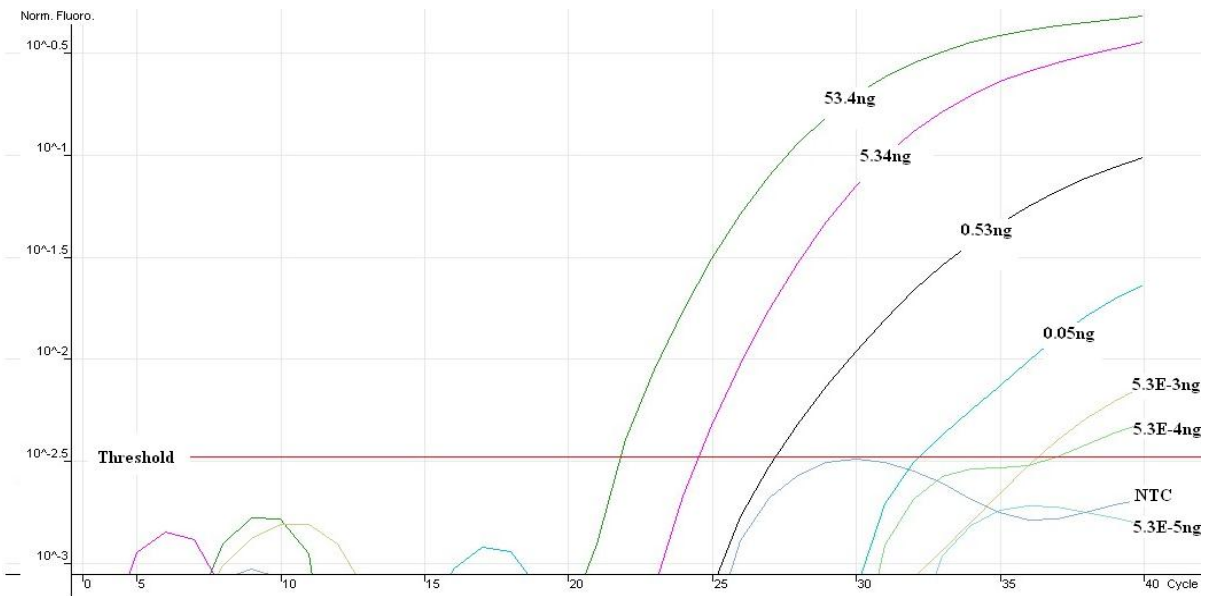
6. Estudio del límite de genotipificación de los kits Factor II Real Time (RG), MTHFR (C677T) Real Time (RG) y Factor V Real Time (RG)

Se determinó el límite de genotipificación de los kits por medio de diluciones seriadas de una muestra de ADN_g humano cuantificado en 26,7 ng/μl, en una solución con ADN_g de *E. coli*. En la Tabla 15 se resumen los datos obtenidos con los diferentes kits. A partir de estos datos se determina la cantidad mínima de ADN_g en la reacción de PCR para luego visualizar los SNPs en las curvas de melting.

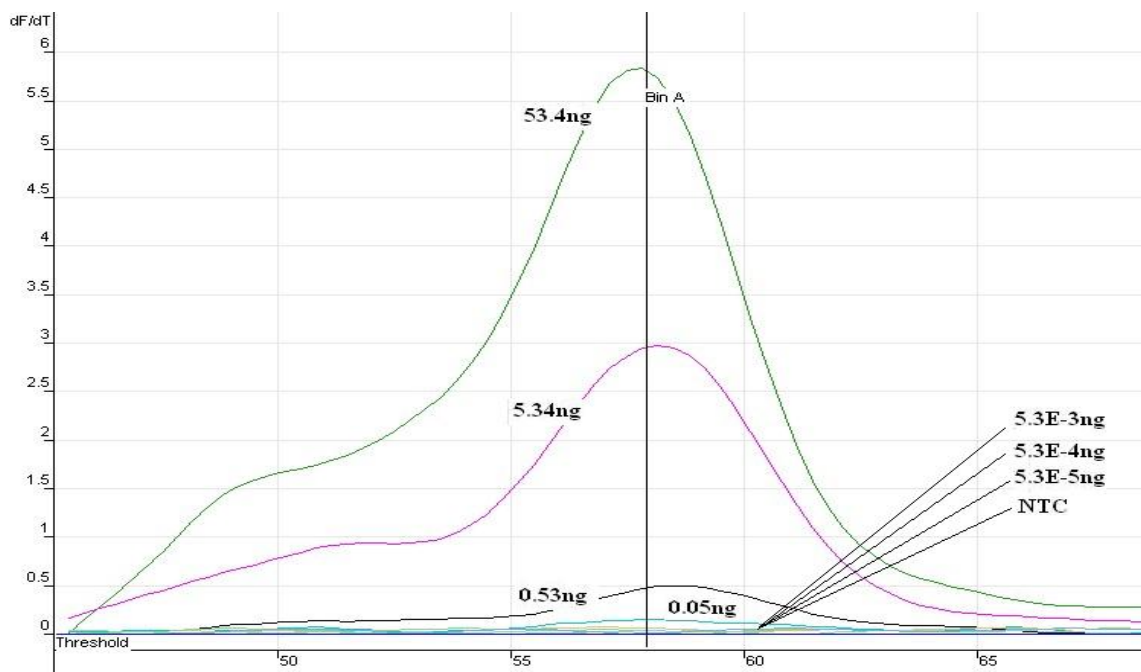
Tabla 15. Se muestran los resultados obtenidos con las diluciones seriadas de ADN_g humano en ADN_g de *E. coli*. Utilizando los kits para detectar la mutación de FV, FII y MTHFR. Se muestran las concentraciones de ADN_g humano como molde y las concentraciones de ADN total utilizadas en cada reacción de PCR. NTC reacción de control sin ADN como molde, S/A sin amplificación debido a que la señal de fluorescencia es menor a la línea de threshold.

Dilución ADN _g Humano	CT			Concentración ADN genómico	
	KIT FII	KIT FV	KIT MTHFR	ADN humano (ng/reac.)	ADN total (ng/μl)
1	23,23	21,80	23,59	53,40	26,70
0,1	25,82	24,54	26,93	5,34	16,10
0,01	29,13	27,24	S/A	0,53	14,00
0,001	32,04	32,22	S/A	0,05	16,10
0,0001	36,85	36,37	S/A	5,34E-03	15,30
0,00001	S/A	S/A	S/A	5,34E-04	15,70
0,000001	S/A	S/A	S/A	5,34E-05	15,70
NTC	S/A	S/A	S/A	-	-

Como se muestra en la Tabla 15, es posible amplificar en la reacción de PCR hasta la dilución 0.0001 para los kits FII y FV mientras para MTHFR fue de 0.1, es decir 5,34 ng de ADN genómico como molde en la reacción de PCR. De todas formas la amplificación de la reacción de PCR por si sola no indica la genotipificación, para esto es necesario observar los picos de melt en la función df/dt . Como se muestra en la Figura 17 y 18 solamente el ADNg puro y la dilución 1/10 para los kits FV y FII es posible discriminar los genotipos. Tomando esto en cuenta, fijamos para los 3 kits una cantidad de ADN por reacción de PCR de 5 ng como valor mínimo. A partir de estos datos y considerando el sistema de extracción de ADN utilizado (el cual no forma parte del kit desarrollado), se recomienda utilizar los correspondientes kits para la reacciones de PCR a partir de una solución de ADN del entorno de los 25 ng/ μ l de ADN, ver Figuras 16 y 17.

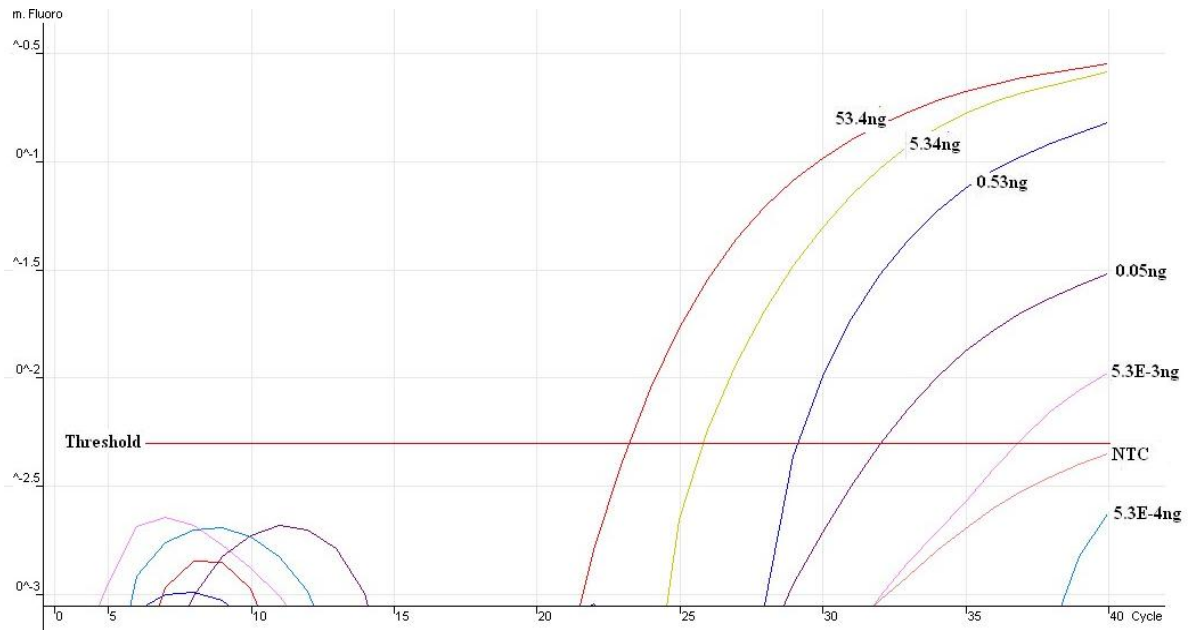


A

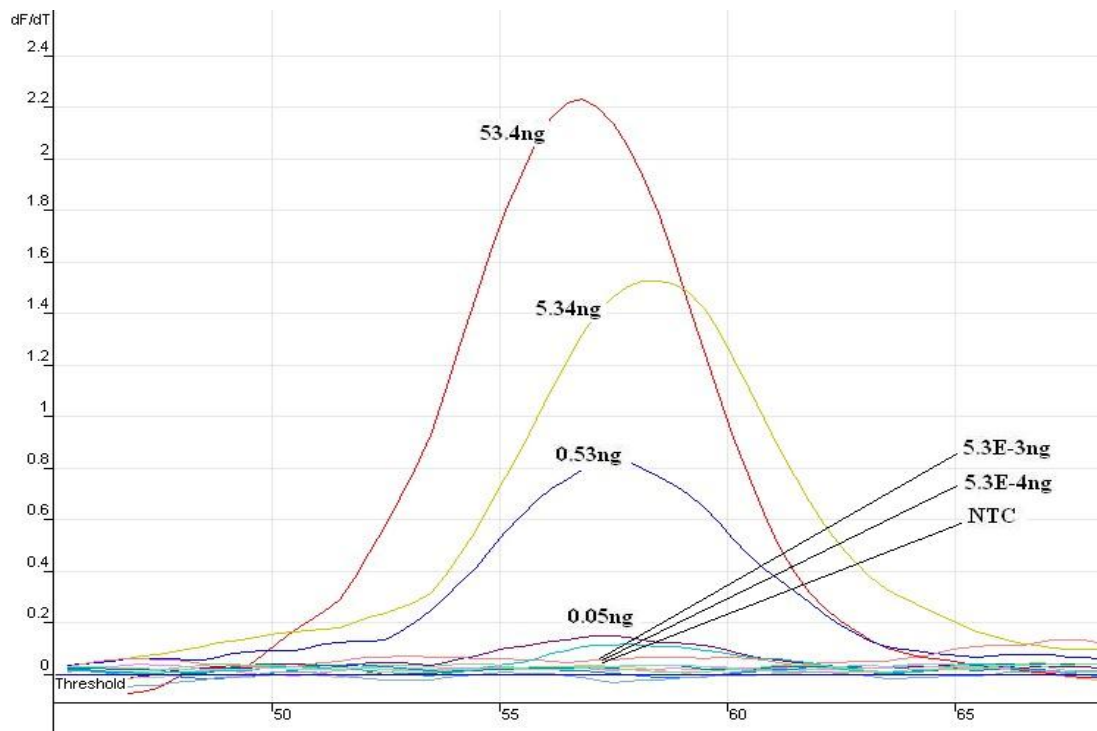


B

Figura 17. Curvas amplificación y melting para el Kit FV en diluciones seriadas de ADNg. A) Fluorescencia en función de los ciclos de amplificación con el kit FV para diferentes diluciones con sus respectivos ng de ADN por reacción. B) Derivada del valor de fluorescencia en función de la temperatura, para el genotipo (G1691G/G1691G) a partir del ensayo de amplificación A.



A



B

Figura 18. Curvas amplificación y melting para el Kit FII en diluciones seriadas de ADNg. A) Fluorescencia en función de los ciclos de amplificación con el kit FII para diferentes diluciones con sus respectivos ng de ADN por reacción. B) Derivada del valor de fluorescencia en función de la temperatura, para el genotipo (C20210G/C20210A) a partir del ensayo de amplificación A.

7. Estudio de especificidad en la caracterización genética

Validación interna

Se realizó una validación interna en nuestro laboratorio, para esto se produjeron por normas GMP varios lotes de los kits Factor II Real Time (RG), MTHFR (C677T) Real Time (RG) y Factor V Real Time (RG) y se reservaron para genotipar 250 muestras para cada mutación. Las muestras utilizadas conforman una genoteca correspondientes a pacientes de riesgo que llegan ATGen, al área de servicios. Estas son enviadas por el personal médico para tomar decisiones clínicas asociada la presencia de los SNPs en pacientes con sospechas de eventos tromboticos. La presencia o ausencia de las mutaciones para cada muestra fue comparada con los resultados obtenidos por la técnica de PCR RFLP. La cual se basa en la amplificación por PCR de la región con el SNP y posterior digestión con enzimas de restricción las cuales generan un patrón de bandas características que son visualizados en geles de acrilamida, ver Figura 22. Los resultados obtenidos indican un 100% de concordancia con la técnica de referencia, ver Tabla 16.

Tabla 16. Resultados del ensayo de validación interna. NN genotipo normal homocigota, NM genotipo heterocigota, MM genotipo mutado homocigota.

Genotipo	FII (G20210A)			MTHFR (C677T)			FV (G1691A)		
	Kit FII	PCR RFLP	Frecuencia	Kit MTHFR	PCR RFLP	Frecuencia	Kit FV	PCR RFLP	Frecuencia
NN	237	237	95%	90	90	14%	225	225	90%
NM	13	13	5%	125	125	50%	25	25	10%
MM	-	-	-	35	35	36%	-	-	-
Indeterminado	0	0	0%	0	0	0%	0	0	0%
Total	250	250	1	250	250	1	250	250	1

Los resultados presentados en la Tabla 16 indican que la especificidad diagnóstica de cada kit es absoluta. Cabe destacar que a partir de 250 muestras de sangre, correspondientes a pacientes, remitidas

a nuestro laboratorio se analizaron por ambas técnicas los genotipos y los resultados fueron absolutamente concordantes. Debido a la frecuencia de las mutaciones en las poblaciones no es posible hallar muestras homocigotas mutadas (MM) para las mutaciones G2010A y G1691A. La baja frecuencia en los genotipos homocigotas mutados encontrados en este estudio para Uruguay la prevalencia de la mutación FV es del 5% en las poblaciones de origen europeas occidental y prácticamente inexistentes en indígenas americanos, asiáticos y africanos, esta proporción se mantiene para la región, 5.1% Buenos Aires, 3.1% Santiago de Chile, 2% San Pablo (Lens *et al.* 2000).

Validación externa

Mediante la participación en el programa MGL1 (Molecular Genetics) del College of American Pathologists (CAP), se realizó el control de calidad externo. En este el laboratorio externo de referencia envía 6 muestras al año, a los 390 laboratorios suscriptos en distintas partes del mundo. Los laboratorios participantes analizan las muestras de ADN y el método por el cual se identifica el genotipo y esta información es remitida al laboratorio de referencia. Vale la pena destacar que participaron 390 laboratorios y cada uno aplica técnicas de genotipificación diferentes. En este sentido se reportaron diferentes técnicas como PCR 57.2%, química de invasión 21.7 %, PCR ARMS (alelo específica) 5%, tecnología de microarreglos 6.6, bead array 1.7%, secuenciación de ADN 1.9%, pirosecuenciado de ADN 0.6%, espectrometría de masa 0.6%, ensayo de ligación de oligonucleótidos 0.6% otras técnicas 2.8% y 1.4% de los laboratorios participantes no declara la técnica utilizada. Por otro lado se participó de un programa similar pero de alcance nacional ver Tabla 18, a diferencia del internacional en este el número de participantes es menor 6, y no se reportan las técnicas utilizadas durante la genotipificación.

Tabla 17. Resultados del control de calidad externo las muestras fueron remitidas por el programa Molecular genetics MGL 1 2009 y 2010 del CAP. NN genotipo normal homocigota, NM genotipo heterocigota, MM genotipo mutado homocigota.

Envío	Muestra (ADN)	FV (G1691A)	FII (G20120A)	MTHFR (C677T)	Numero de laboratorios participantes
MGL-B 2008	MGL1-07	MM	S/D	S/D	303
	MGL1-08	NM	S/D	S/D	
	MGL1-09	MM	S/D	S/D	
MGL-A 2009	MGL1-01	NN	S/D	S/D	310
	MGL1-02	NM	S/D	S/D	
	MGL1-03	NN	S/D	S/D	
MGL-B 2009	MGL1-07	NM	NM	NM	300
	MGL1-08	MM	NN	NN	
	MGL1-09	NN	NN	NM	
MGL-A 2010	MGL1-01	NN	NN	NM	360
	MGL1-02	NN	NN	MM	
	MGL1-03	NM	NN	NM	

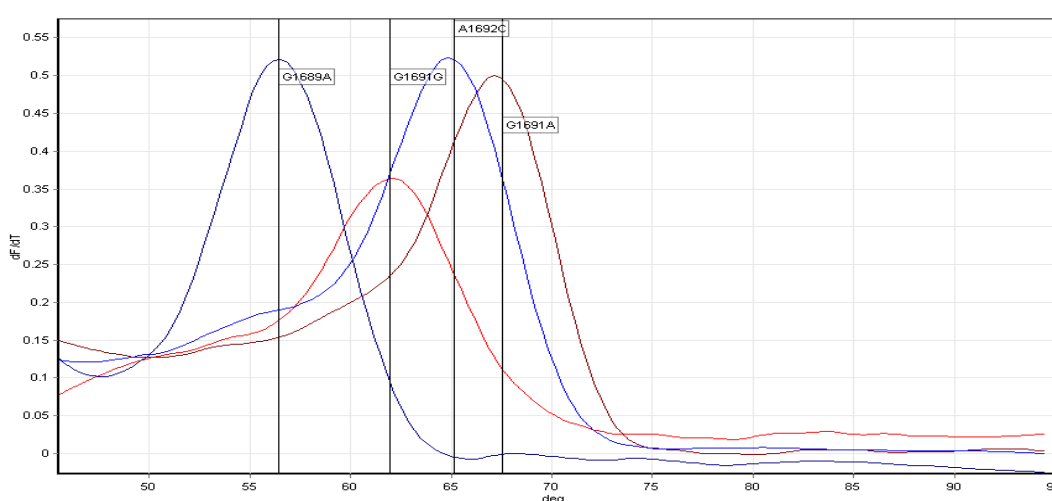
Tabla 18. Resultados de control de calidad externo remitidas por laboratorio nacional. NN genotipo normal homocigota, NM genotipo heterocigota, MM genotipo mutado homocigota.

Envío	Muestra (Sangre)	FV (G1691A)	FII (G20120A)	MTHFR (C677T)	N° Laboratorios participantes
Oct/2009	V	NM	NN	MM	6
	I	NN	NM	NN	
	J	NN	NN	NM	

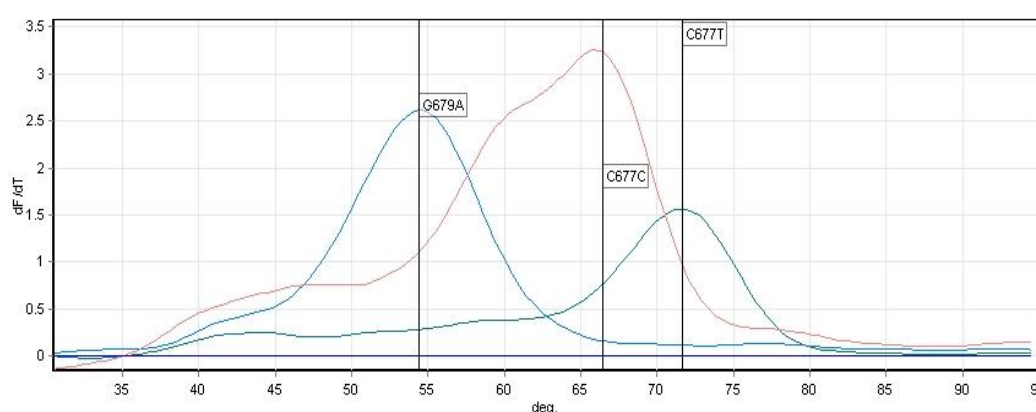
La tecnología desarrollada fue desafiada en nuestro laboratorio con otra técnica (validación interna) y con muestras provenientes de otros laboratorios (validación externa) y en todos los casos la asignación de genotipos para cada muestra fue la correcta. Estos ensayos de validación brindan mayor apoyo estadístico a los resultados obtenidos al utilizar los kits desarrollados. A su vez estos datos fueron presentados ante el MSP para obtener el correspondiente registro y su posterior comercialización.

8. Estudio de limitaciones e interferencias en cada kit

Consideramos una interferencia en la técnica a una mutación o cambio de base en la secuencia de ADN donde hibrida la sonda, ya que esto, en principio, puede cambiar la temperatura de melting e interferir con las asignaciones de genotipos. Vale la pena resaltar que la correspondiente amplificación no se ve afectada con la presencia de otros SNPs en la región donde hibrida la correspondiente sonda. Por lo que se estudió las curvas de desnaturalización de las mezclas con oligonucleotidos con la presencia de las mutaciones raras, ver Figura 19.



A



B

Figura 19. Estudio de interferencia por mutaciones infrecuentes en la asignación de genotipos. Derivada de la fluorescencia en función de la temperatura, o curvas de desnaturalización de las sondas con secuencias de ADN sintéticos con SNP A) A1692C, A1696G, A1689A con el kit FII y B) mutaciones raras C677C y G679A, con el kit C677T.

Debido a que cada genotipo se corresponde a una temperatura específica de melt, un corrimiento de esta mayor a 5 °C sería interpretado como indeterminado. Esto se apoya en los datos estadísticos y desvío estándar presentados en la Tabla 20, en donde cada genotipo se asocia a una temperatura de melting T_m o pico de melt.

Tabla 20. Asignación de genotipos para cada kit desarrollado. Análisis de 250 muestras para cada kit donde se determina la temperatura de melting o pico asignado a cada genotipo así como el desvío estándar.

Kit	MTHFR (C677T) Real Time (RG)		Factor II Real Time (RG)		Factor V Leiden Real Time (RG)	
	C677C	C677T	G20210G	G20210A	G1691G	G1691A
Pico	bin A	bin B	bin A	bin B	bin A	bin B
Promedio (T_m)	59.2	65,8	56	65	59.5	65,73
Desvío est.	1,68	1,63	0,6	0,59	0,54	0,60
Total de muestras	250		250		250	

Durante el transcurso del presente trabajo se realizó el genotipado en el laboratorio de más de 1.000 muestras de sangre para la mutación G20210A y más de 2.500 para la mutación C677T y G1691A. No se ha reportado corrimientos en la T_m , por lo que no se detectó la presencia de estas mutaciones raras. Cabe mencionar que, si bien no hay datos para la frecuencia de estas en Uruguay, a nivel mundial la frecuencia de aparición es baja (del entorno de 1 en 4200 muestras para la mutación en el gen FV (Erali *et. al* 2003).

9. Estabilidad de los kits en función de la temperatura de almacenado

Bajo normas GMP se elaboraron 3 lotes de cada uno de los correspondientes kits y se almacenaron a diferentes temperaturas como se describió en materiales y métodos. Los ensayos fueron denominados: natural, acelerado y ciclos de congelado según la temperatura de almacenado.

Los kits desarrollados soportan 5 ciclos de congelamiento-descongelamiento consecutivos y son estables al menos durante 18 meses almacenados a -20 C. Con estos datos es posible determinar una fecha de vencimiento de 18 meses desde la fabricación del producto, así como asignar condiciones de almacenamiento del entorno de -20 °C y evitar descongelar más de 5 veces consecutivas. Estas especificaciones de los kits se detallan en los instructivos de uso. Debido a que las sondas que componen la mezcla de reacción son sensibles a la luz visible estos componentes deben ser protegidos de la luz visible, si bien no se estudió este fenómeno sobre la mezcla de reacción como medida en la fabricación de los kits se incorporarán tubos color ámbar para evitar que la luz afecte las sondas.

En la figura 19 se observa un decaimiento mayor al 50% de las unidades de fluorescencia en la descongelación número 6 y 7 se recomienda no descongelar más de 5 veces consecutivas las mezclas de reacción, vale la pena destacar que es posible genotipar las muestra hasta el descongelado 7 pero el decaimiento de la fluorescencia afecta la calidad y la precepción del producto por lo debe evitarse esta situación.

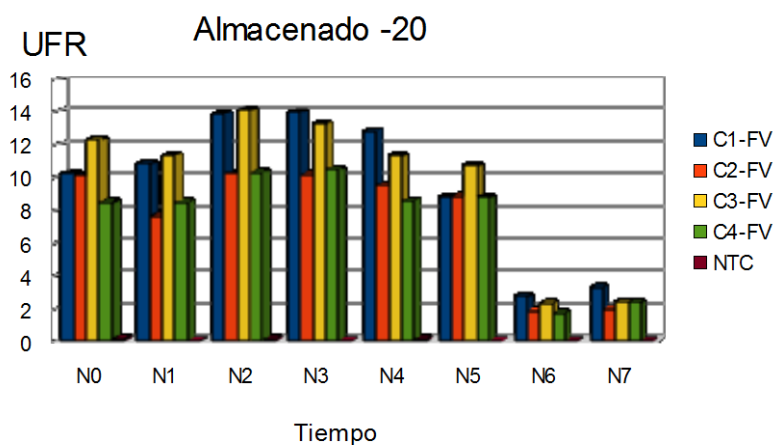


Figura 19. Estudio de ciclos de congelados. Efecto del congelamiento y descongelamiento sobre el kit Factor V Real Time (RG). Unidades relativas de fluorescencia UFR, para el genotipado de 4 muestras de referencia C1 a C4 en función de ciclos de congelamiento y descongelamiento N. NTC reacción de PCR sin mole de ADNg.

En la Figura 20 se muestra los resultados a temperatura ambiente, estos indican un fuerte decaimiento en la fluorescencia luego de 4 días a temperatura ambiente (ver muestra N2). Por dicho motivo, se recomienda almacenado de los reactivos a una temperatura de -20 °C y con un límite máximo de 5 descongelamientos consecutivos. Para su transporte y comercialización, se recomienda evitar tiempos mayores a 2 días a temperatura ambiente. Los datos son acordes a los reportados en las hojas técnicas (almacenado y estabilidad) de otros fabricantes.

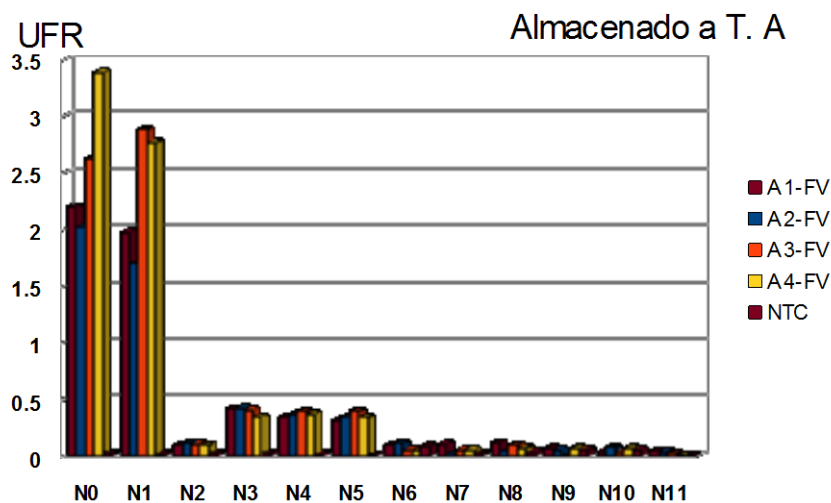


Figura 20. Estudios acelerados. Kit Factor V Real Time (RG) almacenado a temperatura ambiente. Unidades de fluorescencia relativa (UFR). Genotipado de 4 muestras de referencia A1 a A4 en función del tiempo N cada 2 días. NTC reacción de PCR sin mole de ADNg.

El estudio de kits similares presentes en el mercado determina la fecha de vencimiento en 18 meses desde su fabricación. Tomando esto como referencia, se estudió la estabilidad de nuestros kits en este periodo de tiempo, de modo de poder asegurar la calidad en dicho periodo. En la Figura 21 se describen los resultados obtenidos en este estudio demostrando niveles de fluorescencia y correcto genotipado durante 18 meses de almacenado a -20°C

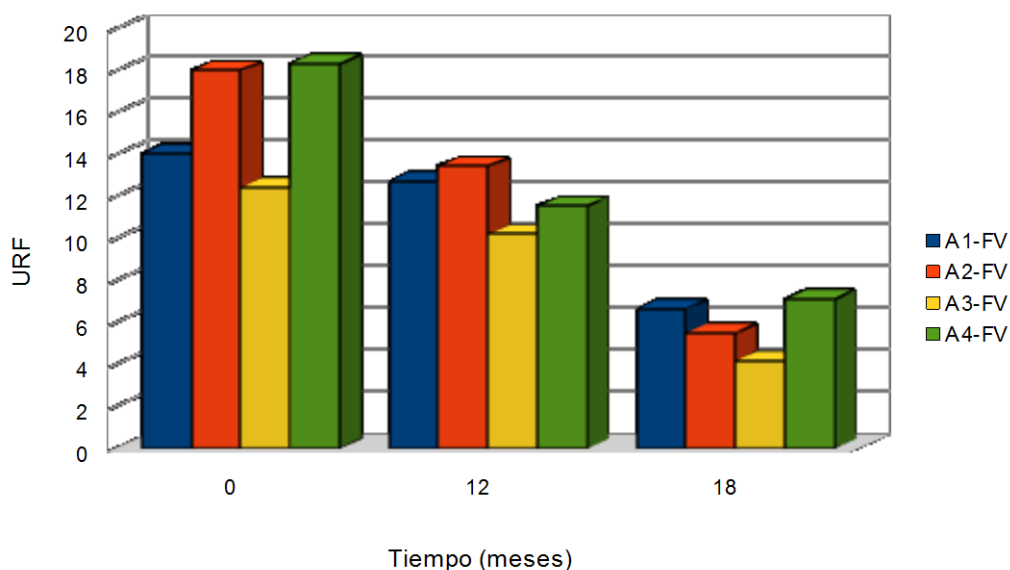


Figura 21. Estudios natural (almacenado a -20) para el kit Factor V Real Time (RG). Con cuatro muestras de referencia A1 a A4. Unidades de fluorescencia relativa (UFR).

Debido a que esta familia de productos comparte la misma tecnología y composición química los resultados de estabilidad natural, acelerada y ciclos de descongelamiento obtenidos en el kit FV Real Time se consideran extrapolables a los FII Real Time (RG) y MTHFR (C677T) Real Time (RG) y viceversa.

10. Análisis de costos

Para el análisis de costos se tomó como modelo el Kit Factor V Real Time (RG), y se compararon los costos asociados a la mezcla de reacción y horas hombres asignadas a cada técnica (ver tabla 21).

Por medio de la tecnología desarrollada es posible reducir los costos a la mitad. Aunque la mayor ventaja la presenta la reducción de tiempo asociada a la técnica, 3 horas frente a 9 horas para la técnica de PCR RT y PCR RFLP respectivamente, ver Figura 22.

Insumo	Cantidad (µl) por reacción	Precio (U\$S)
Buffer STR 10x	2.0	0.0308
Taq (5U/ul)	0.5	0.2750
Cebador directo	2.0	0.0070
Cebador reverso	0.3	0.0013
Sonda A FAM	0.5	0.0271
Sonda B Cy5	0.5	0.0813
Agua Nucleasa Free	12.3	0.0011
Total	18.1	0.4236
20% de error		0.0847
Costo total por reacción de PCR		0.51

A

Insumo	Cantidad (µl) por reacción	Precio (U\$S)
Buffer STR 10x	2	0.0308
Cebadores	0.25	0.0006
Agua Nucleasa Free	12.75	0.0010
Taq (5U/ul)	0.2	0.2750
Enzima HindIII (10U/ul)	0.5	4.00E-006
Marcador de peso molecular	5	0.0830
TBE 1x	-	0.4000
Buffer de carga	-	1.50E-005
Solución Fijador	-	0.0080
Solución Nitrato de plata	-	0.0023
Solución Revelador	-	0.0200
Total		0.8207
20% de error		0.1641
Costo total por reacción de PCR		0.98

B

Tabla 21. Principales costos asociados a las mezclas de reacción para detección de la mutación G1691A por medio de la tecnología A) PCR RT B) PCR RFLP.

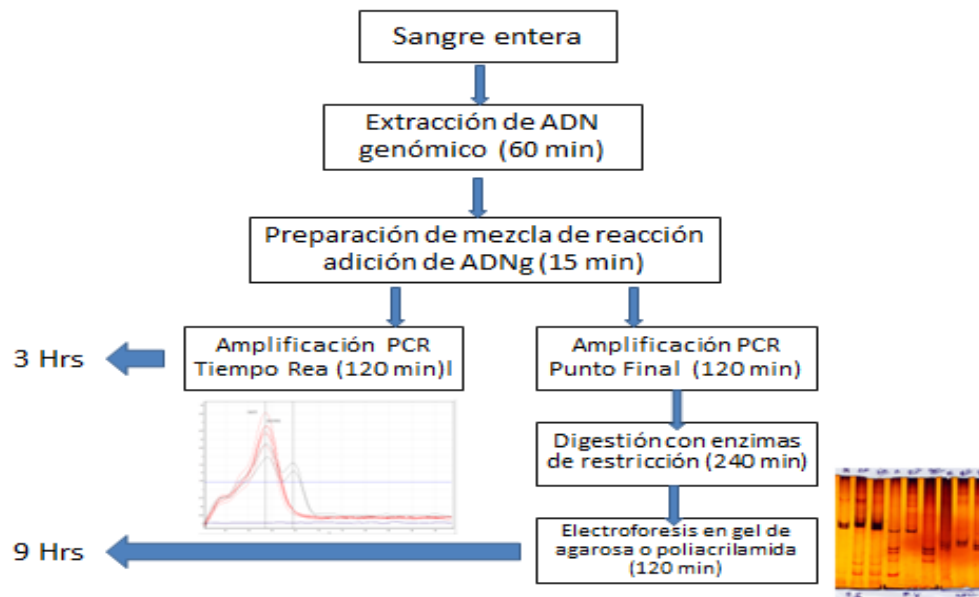


Figura 22. Comparación de etapas y tiempos asociados al PCR en tiempo final y al PCR en tiempo final con digestión enzimática. La técnica de PCR RFLP implica amplificación por PCR de la región del ADN donde se encuentra la mutación, seguida del análisis de la detección del cambio de base mediante digestión con enzimas de restricción (RFLP) y visualización de los fragmentos en gel de agarosa o poliacrilamida, la técnica determina la presencia o ausencia de mutaciones en 9 horas aproximadamente. En la técnica de PCR en Tiempo Real la amplificación se realiza en tiempo real e inmediatamente se discrimina los diferentes alelos por curvas de disociación o curvas de melt.

Si consideramos únicamente los insumos, los costos por reacción son aproximadamente el doble en las reacciones de PCR RFLP que para las de PCR RT. Cabe destacar que, en el presente trabajo, no se consideran los costos amortizados por el laboratorio que implementa el servicio de diagnóstico. Se observó un importante decremento de las horas hombre asociadas a cada técnica. La técnica desarrollada insume unas 3 horas asignadas a la amplificación y genotipado por curvas de melting a diferencia de las 9 horas asignadas a la técnica de PCR RFLP, ver Figura 22. Al minimizar el número de pasos la técnica de PCR en Tiempo Real se torna más fácil de abordar por técnicos no calificados en biología molecular. También se minimiza la posibilidad de contaminación ya que los tubos con los productos amplificados nunca son abiertos para su análisis, y por otra parte esta técnica permite la posibilidad de manipular gran cantidad de muestras.

V- Conclusiones

El diagnóstico molecular de ciertas mutaciones como el caso de las estudiadas en el presente trabajo puede realizarse por diferentes técnicas, tales como PCR RFLP, PCR alelo específico, secuenciación de ADN, microarreglos, espectrofotometría de masa, entre otras. En el presente trabajo se decidió desarrollar una tecnología de PCR en Tiempo Real, debido a que presenta características favorables en la aplicación en biología molecular dentro de las que se destacan: tiempos de manipulación reducidos en comparación con otras técnicas (debido a que la mezcla de reacción incorpora todos los componentes necesarios para realizar la PCR), mínima posibilidad de contaminación cruzada con productos previamente amplificados (la reacción tiene lugar en tubos cerrados), menores pasos de manipulación y costos menores asociados a personal técnico. La técnica permite automatizar la manipulación y acceder fácilmente a analizar un gran número de muestras. Estas características se complementan con la sensibilidad y especificidad del PCR. Los kits desarrollados se detallan a continuación:

El kit Factor V Leiden Real Time (RG), detecta y genotipa el polimorfismo G1691A. Se compone de: 3 viales, un vial tapa color amarillo (mezcla de reacción de PCR), un vial tapa transparente (control negativo), un vial tapa color rojo (ADN control positivo, genotipo G1691A/WT), una caja contenedora y el protocolo de uso, también denominado IDK.

El kit MTHFR (C677T) Real Time (RG) genotipa el polimorfismo C677T. Se compone de un vial tapa color amarillo (mezcla de reacción de PCR), un vial de tapa transparente (control negativo), un vial de tapa color rojo (ADN control positivo, genotipo C677T/WT), caja contenedora de viales y protocolo de uso IDK.

El kit Factor II (G2010A) Real Time (RG) genotipa el polimorfismo G2021A. Se compone de un vial tapa color amarillo (mezcla de reacción de PCR), un vial de tapa transparente (control negativo), un vial de tapa color rojo (ADN control positivo, genotipo G2010A/WT), caja contenedora de viales y protocolo de uso o IDK.

Desde el punto de vista comercial se detectó una necesidad de la utilización de kits de biología molecular en diferentes laboratorios de diagnóstico, incluido el nuestro, lo cual motivo el desarrollo de kits por PCR en Tiempo Real. La resolución de estos diagnósticos moleculares son recogidos en última instancia por los médicos y estos toman decisiones basados en la información genética del paciente (por ejemplo administración periódica de anticoagulantes). A la fecha se ha utilizado la tecnología desarrollada para genotipar 1757 pacientes para la mutación C677T, 2420 pacientes para la mutación G20210A y 3371 G1691A. En este sentido los kits desarrollados, son utilizados por la empresa para prestar servicio de genotipificación y se plantea la incorporación de sistemas automáticos, en la etapa de extracción de ADN, que aumenten la capacidad a una escala mayor.

De los protocolos evaluados para la obtención de ADNg se optó por el sistema de columnas debido a que los resultados indicaron una mayor calidad de las moléculas de ADNg. Este sistema de purificación de ADN a partir de muestras de sangre no forma parte de los kits, aunque es utilizado en la producción del ADNg como control positivo de los correspondientes productos.

Los resultados previos a la obtención del ADN indican que es posible utilizar una solución de ADNg con una concentración de 25 ng/ μ l ya que concentraciones menores podrían generar un nivel de fluorescencia insuficiente en la amplificación por PCR RT.

A la luz de los resultados obtenidos, los kits desarrollados presentan una especificidad absoluta en la caracterización genética, es decir, que la clasificación de los genotipos de cada muestra de sangre se realizó en total concordancia con la técnica de referencia.

Estos datos avalan la confiabilidad de los kits desarrollados para la determinación de los genotipos y fueron utilizados para su registro ante el Ministerio de Salud Pública con los números de registro, 41955 para el kit Factor V Leiden Real Time (RG), 45179 para el kit MTHFR (C677T) y 45180 para el kit Factor II Real Time (RG)

Los experimentos de estabilidad permitieron asignar condiciones de almacenamiento y fechas de caducidad donde la calidad de los kits permanece aceptable, es decir almacenados a -20°C por 18 meses. Por otra parte, al igual que los declarados por otros fabricantes (Roche), los kits soportan 5 ciclos de descongelados sucesivos.

En este sentido también otros fabricantes informan como limitaciones de los kits la ocurrencia de mutaciones raras en la zona de hibridación de las sondas, lo que puede modificar las T_m asignada a los genotipos. En todos los casos los resultados indican que la aparición de estas se informaría como indeterminado.

En cuanto a los costos, los estudios realizados permitieron asegurar la competitividad de los kits y márgenes acordes para amortizar la inversión asumida en el desarrollo.

Finalmente cabe mencionar que en la actualidad se evalúa la viabilidad de utilizar diferentes sondas capaces de detectar y clasificar las mutaciones en una única reacción de PCR. Es decir una

reacción tipo multiplex. Al realizar una única reacción de PCR es posible minimizar costos y tiempos asociados al uso de equipos y operarios.

La tecnología desarrollada permite automatizar y manejar gran número de muestras fácilmente, lo que le brinda una ventaja competitiva a la empresa. Esta característica permitió que se ganara una porción mayor del mercado y puedan presentarse a licitaciones públicas del MSP.

Por otro lado la tecnología puede ser aplicada para realizar ensayos a nivel nacional y determinar la frecuencia de los SNPs en la población con y sin eventos trombóticos. Aportando conocimiento científico a la enfermedad trombofilia en pacientes uruguayos.

VI-Agradecimientos

Muchas son las personas que, de una u otra forma, han colaborado con la materialización de este proyecto. Aunque soy consciente la omisión de algunas espero reciban todas ellas mis más sinceros agradecimientos.

A mi familia, Gabriela, Franco, Sofía y Luciano, que les he robado tiempo para dedicarle a este trabajo. A mis Padres y mis suegros que incondicionalmente me apoyaron.

A todos los compañeros de ATGen que me transmitieron los problemas prácticos a resolver.

A Manuel Sanguinetti, que desinteresadamente leyó esta tesis.

VII- Bibliografía

Arderiu X., Lacambra M., Campano J., **Bioquímica clínica y patología molecular. II.** Editorial

Reverete S.A. Volumen 2., 1998 ISBN 842911855-1., 1998.

Ausubel F, Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman, G., Smith.A., Struhl K., **Preparation of DNA from cells or tissue samples for PCR: cells or tissue samples are incubated over night at 50°C**

with 100 µg/ml proteinase K. Current Protocols in Molecular Biology. Supplement 17 Page 15.3.1;

Greene Publishing & Wiley-Interscience, New York, 1995.

Bertina M., Koelman B., Koster T., Rosendaal F., Driven R., Donde H., van der Velen P., Reitsma P.

Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C.

Nature Vol. 369. pp 64 - 67. May. 1994.

Boom R., Sol C., Salimans M., Jansen C., Wertheim-van P., van der Noordaa J., **Rapid and simple method for purification of nucleic acids.** J. Clin. Microbial. Vol 28 (3) pp495-503. 1990.

Cao Y., Xu J., Zhang Z., Huang X., Zhang A., Wang J., Zheng Q., Fu L., Du J., **Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis.** Gene. Vol (Feb 10;514). pp. 105 a 111. 2013

College of American Pathologists and Anatomic Pathology Educations Programs, Surveys 2009.

Participant Summary. www.cap.org. Consultado marzo 2012

Colpan 2002 M., Scherr J.,Herrman P., Feusr P.,**Chromatographic purification and separation process for mixtures of nucleic acids.** US Patent 6,383,393, 2002

Bustin S., **A-Z of Quantitative PCR.** Editor International University Line. La Jolla C.A. ISBN

09636817-8-8. 2004

De Stefano V., Martinelli I., Mannucci P., Paciaroni K., Chiusolo P., Casorelli I., Rossi E., Leone G.

The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and G20210A prothrombin mutation. N Engl J., Vol (341) pp. 801-806.1999

Dorak T., **Real time PCR.** Editorial Tylor y Francis Group Nueva York. ISBN 1-415-37734-X. 2006

Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, Arruda V,

Hillarp A, Reny JL. **Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism--pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls.** Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. Thromb.

Haemost. Vol. (Sep;86(3)) pp., 809 a 816. 2001

Egeberg O. **Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia.** Thromb. Diath.

Haemorrh. Vol (15) pp 13-30. 1965

Erali M., Voelkerling K., Wittwer C., **High resolution melting applications for clinical laboratory medicine.** Exp. Mol. Phayhol. Vol 85(1). pp 50-58. 200.

Eurogenetec. www.erogenetec.com. Consultado junio 2012.

French D., Archard C., Brown T., McDowell D., **HyBeacon probes: a new tool for DNA sequenc detection and allele discrimination.**Mol Cell Probes.Vol. Dec, 15(6) pp:363-74. 2004

Glueck C., Awadalla S.,Phillips H., Cameron D., Wang, P., Fontaine R., **Polycystic ovary syndrome, infertility, familial thrombophilia, familial hypofibrinolysis, recurrent loss of in vitro fertilized embryos, and miscarriage.** Fertil. Steril.. Vol. 74. pp 394-7. 2000.

Guilland JC, Favier A, Potier de Courcy G, Galan P, Hercberg S. **Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease?.** Basic data. Pathol Biol. Vol. 51 Mar.pp 101-10. 2003

Hoshi S, Hijikata M, Togashi Y, Aoyagi T, Kono C, Yamada Y, Amano H, Keicho N, Yamaguchi T. Protein C deficiency in a family with thromboembolism and identified gene mutations. Intern Med. Vol. 46(13) pp 997-1003. 2007.

Lane, D.A.; Mannucci, P.M.; Bauer, K.A.; Bertina, R.M.; Bochkov, N.P., Boulyjenkov, V., Chandy M., Dahlbäck B., Ginter E.K., Miletich, J.P.; Rosendaal, F.R.; Seligsohn, U., **Inherited thrombophilia: Part 1.** Thromb. Haemost. Vol. 76, pp 651-62. 1996.

Lens D, Otero A, Cotic G, Henry S, Diaz A, Attarian D, Agorio C, Pierri S. **Diagnóstico molecular de factores protrombóticos: primeros casos de factor V Leiden y protrombina 20210A en Uruguay.** Rev. Med. Uruguay. Vol. 16. pp 39-44. 2000.

Lijnen R. , Collen D. **Mechanisms of physiological fibrinolysis.** Clin. Haematol. Vol., (Jun;8(2)) pp., 277-290. 1995

López A, Macaya M. **Libro de la salud cardio vascular del Hospital Clínico San Carlos y la Fundación BBVA.** Editor Fundación BBVA. Año 2009. ISBN: 978-84-96515-92-5. Capitulo29.

Lyondagger E, Millsdagger A, Phan T, Wittwer CT. **Detection and Identification of Base Alterations Within the Region of Factor V Leiden by Fluorescent Melting Curves.** Mol. Diagn. Vol: Dec;3(4). pp: 203-209. 1998.

Martinelli I, Battaglioli T., De Stefano V., Tormene D., Valdrè L., Grandone E., Tosetto A., Mannucci P., **The risk of first venous thromboembolism during pregnancy and puerperium in double heterozygotes for factor V Leiden and prothrombin G20210A.** J. Thromb Haemost. Vol (Mar;6(3)) pp., 494 a 508. 2008

Mackman N. **The many faces of tissue factor.** J. Thromb Haemost. Vol. Jul;7. Pp. 1:136-9. 2009

Madjunkova S., Volk M., Peterlin B., Plaseska-Karanifiliska D., **Detection of trombofilic mutations related to spontaneous abortions by a multiplex SNaPshot method.** Genet Test Mol Biomarkers. Vol (Abril 16(4))., pp 259 a 264. 2012

Matadamas C., Perez E., Hernandez J., Majluf A. **Nuevos factores de riesgo cardiovascular: hiperhomocisteinemia.** Rev. Med. IMSS. Vol. 41. pp 235-249. 2003

Matsuo K., Suzuki R., Hamajima N., Ogura M., Kagami Y., Taji H. **Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma.** Blood Vol., 97. pp 3205 a 3209. 2001.

Merino R., Santiago J., Teránc J., **Epidemiology of Venous thromboembolic disease in Spain.** Medicina Clinica., Vol (131) pp. 2 a 9. 2008

Miles J., Miletich J., Goldhaber S., Hennekens C., Ridker P., **G20210A mutation in the prothrombin gene and risk of recurrent venous thromboembolism.** J. Am. Coll. Cardiol. Vol. 37. pp215-218. 2001.

Napolés C., Napoles D., **Homostasia normal y coagulación intravascular diseminada en obstetricia.** Medisan., Vol. 13 (3) pp. 401-428. 2012.

Nair R., Khanna A., Singh K., **MTHFR C677T polymorphism and recurrent early pregnancy loss risk in north Indian population.** Reprod. Vol (Feb;19(2)). pp 210 a 215. 2012

NCBI National Center for Biotechnology Information- International HapMap Project
<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>. Consultado Marzo 2012.

Osinaga E. **Bases bioquímicas de la hemostasis.** Oficina del libro FEFMUR 1999

Otero A., Pou R., Pons E., Lens D., De lisa E., Dellapiane M., Storch E., Attarian D., Ferrari A., Pierri S., Motta N., **Trombofilia y perdida recurrente de embarazo**. Rev. Med. Uruguay Vol. 20pp106-113. 2004.

Otero A. **Hemostasis y trombosis**. Editorial Arena. Segunda edición. 2006

Patnaik M., y Moll S. **Inherited antithrombin deficiency: a review**. **Haemophilia**. Vol (14) pp. 1229–123. 2008.

Patrinos G., Andorge J., **Molecular Diagnosis**. Editorial Elsevier. Segunda edición. 2010

Poort S., Rosendaal F., Reitsma P., Bertina R., **A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis**. Blood. Vol (Nov 15-88), pp 3698 a 3703. 1996

Preissner KT. **Physiology of blood coagulation and fibrinolysis: biochemistry**. Hamostaseologie. Vol., (28(5)) pp., 259-71. 2008

Ruiz G., **Fundamentos de Hematología**. Editorial Médica Panamericana. Cuarta edision. ISBN., 878-607-7743-04-0

Roche http://www.roche.es/portal/roche-spain/medicina_personalizada_

Kalafatis M., Rand M., Mann K., **The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C**. J. Biol Chem. Vol., (Dec 16). pp. 269 a 279. 1994

Kalafatis M., Bertina R., Rand M., Mann K., **Characterization of the molecular defect in factor VR506Q**. J. Biol Chem. Vol (24;270(8)) pp 4053 a 4057., 1995

Kennedy S., Oswald N., **PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide Book**. Publisher: Caister Academic Press. ISBN: 978-1-904455-72-1. 2011

Rodak B., **Hematología fundamentos y aplicaciones clínicas**. 2da Edición Buenos Aires. Medica Panamericana 2004. ISBN 950-06-1876-1

Sambrook J, Russell D., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** , Vol., 1, 2 y 3.

Teijon J. Garrido A. **Fundamentos de bioquímica estructural**. Editor Tebár Madrid. ISBN: 978-84-7360-228-0. Capítulo 11. 2006

Rosendaal F. Risk factor for venous thrombotic diseases. *Thromb homeost*. Vol. 82, pp 610-619. 1999

Sanguinetti C., Dias Neto E., Simpson A. **Rapid Silver Staining and Recovery of PCR Products separated on Polyacrylamide Gels**. *Biotechniques*. Vol 17(5). pp : 914-921. 1994.

Peter J. Svensson P., y Dahlback B., **Resistance to Activated Protein C as a Basis for Venous Thrombosis** *N. Engl. J. Med*. Vol. (24). Pp. 517-522. DOI: 10.1056/NEJM199402243300801. 1994

Slavik L, Krcova V, Hlusi A, Prochazkova J, Prochazka M, Ulehlova J, Indrak K, **Molecular pathophysiology of thrombotic states and their impact to laboratory diagnostics**. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Republic*. Vol. 153 pp 19–26. 2009

Soria M., **El componente genético de las alteraciones de la coagulación y de la trombosis**. *Revista Española Cariología*. Vol 9.(sup. B)., pp. 58-65. 2009

Tengborn L., **Inhibidores fibrinolíticos en el control de trastornos de coagulación**. *Tratamiento de la Hemofilia*. Noviembre Vol. 42. 2012

Turan O, Ündar B, Günay T, Akkoçlu A. **Investigation of inherited thrombophilias in patients with pulmonary embolism**. *Blood Coagul Fibrinolysis*. Vol. (24(2)) pp. 140-149. 2013.

Tortora G., Anagnostakos N., **Principos de anatomia y fisiologia** .Editor: Harper & Row, .Año: .ISBN: . Capitulo: 4.

Vogelstein B., Gillespie D., **Preparative and analytical purification of DNA from agarose.** Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 76. pp. 615-619, 1979.

Walker F., Fay P., **Regulation of blood coagulation by the protein C system.** The FASEB Journal Vol. 6. pp 2562 – 2567. May , 1992.

Watzinger F., Lion T., **Multiplex PCR for quality control of template RNA/cDNA in RT-PCR assays.** Leukemia Vol. 12(2). pp 1984-1986. 1998.

Wiwanitkit V., **Roles of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in repeated pregnancy loss.** Clin Appl Thromb Hemost. Vol (Jul;11(3)). Pp.,343 a 345. 2005

Wittwer C., Herrmann M., Moss A., Rasmussen R., **Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification.** Biotechniques. Vol. (22)., pp 130 a138., 1997

Wu X., Zhao L., Zhu H., He D., Tang W., Luo Y., **Association between the MTHFR C677T polymorphism and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis.** Genet Test Mol Biomarkers. Vol (Jul;16(7)). pp 806 a 811. 2012

Zwaal R. Hemker H. **New comprehensive Biochimestri -Blood Coagulations-.** Editor: Newberger, Van Deenen. Volumen 13. ISBN: 0-444-80794-2. Año:1986

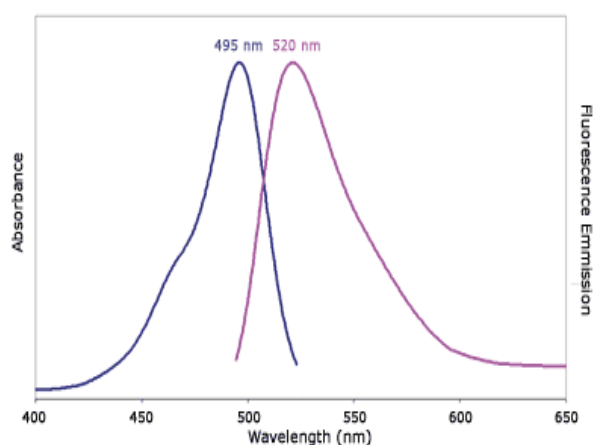
ANEXO 1 – Principales características de las moléculas fluorescente

FAM 6-Carboxifluoresceína

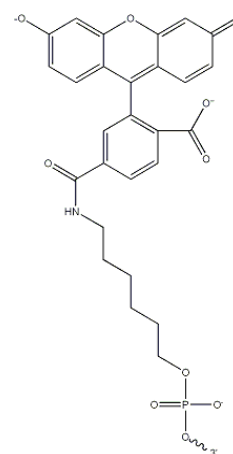
Es una molécula fluorescente ampliamente utilizada. Debido a que es compatible con la mayoría de los sistemas de detección. Puede ser adjuntado a oligonucleótidos tanto en el extremo 5' como 3' de la molécula de ADN. La fluorescencia desciende a pH menor a 7 por lo que se utiliza típicamente en el intervalo de pH 7,5 a 8,5. Se recomienda almacenar a -20 °C en tubos opacos para evitar su exposición excesiva a la luz.

Masa molecular:	537.5
Coefficiente de extinción:	20960
Absorbancia máxima:	495 nm
Emisión máxima:	520 nm
Extinción Coeficiente:	75000

Perfil de absorción y emisión de fluorescencia



Estructura molecular

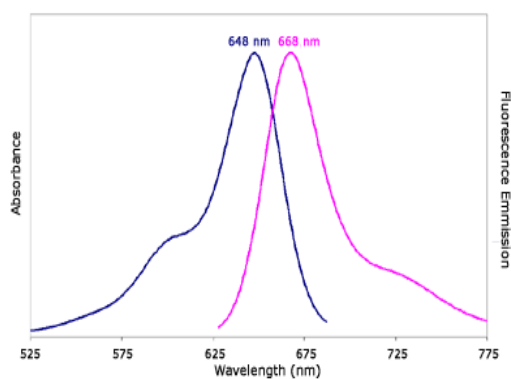


Cy5

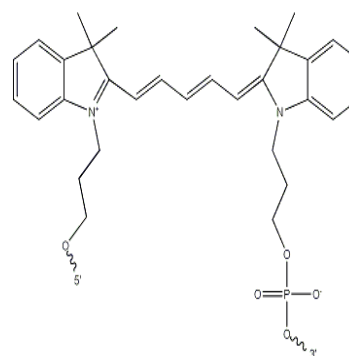
Pertenece a las familias de Cianinas. Puede unirse a cualquiera de los extremos 5' o 3' extremos de un oligonucleótido. Se utilizan como aceptador de fluorescencia por lo que su uso en aplicaciones de microarrays. La producción de esta molécula requiere purificación por HPLC. Lo que aumenta los costos de producto.

Masa molecular:	532.6
Coefficiente de extinción:	10000
Absorbancia máxima:	648 nm
Emisión máxima:	668 nm
Extinción Coeficiente:	250000

Perfil de absorción y emisión de fluorescencia



Estructura molecular

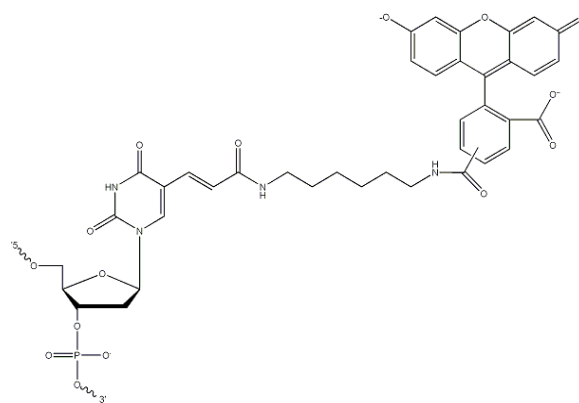
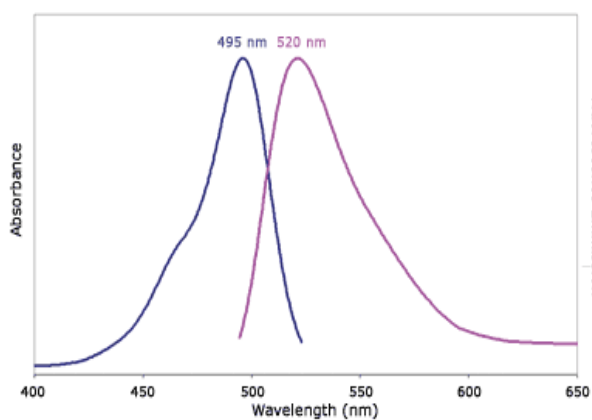


dT

La molécula dT es una base modificada derivada de FAM. En la que la molécula fluorescente se une a la posición 5 del anillo de timina por un brazo espaciador de 6 carbonos. Esta molécula puede ser incorporada en lugar de timina interna al oligonucleótido.

Masa molecular:	816.7
Coefficiente de extinción:	13700
Absorbancia máxima:	495 nm
Emisión máxima:	520 nm
Extinción Coeficiente:	75000

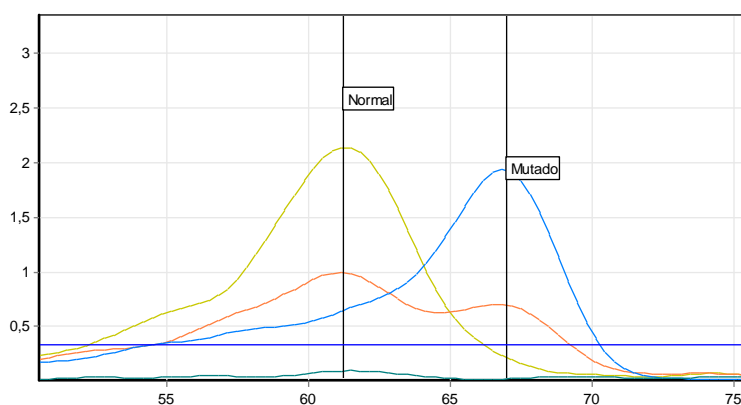
Perfil de absorción y emisión de fluorescencia Estructura molecular



ANEXO 2 –Instructivo de uso para cada kit

Factor V Leiden Real Time (RG)

Sistema para detección, por PCR en tiempo real, de la alteración G1691A en el gen que codifica para el Factor V de la coagulación humana.



Versión 5
Aprobada: 14/10/10

Reg. MSP 41955

Valdense 3616. 11700. Montevideo. Uruguay.
Teléfono (598) 2 336 83 01.
Fax (598) 2 336 71 60.
Info@atgen.com.uy
www.atgen.com.uy

Uso exclusivo en investigación.

Los resultados del test sólo pueden ser utilizados para análisis preliminar.

La compra de este producto no incluye ni proporciona una licencia para llevar a cabo aplicaciones patentadas.

Utilidad del Kit

El kit de ATGen analiza el polimorfismo puntual en la posición 1691 (G1691A) del gen que codifica para el FV de la coagulación humana.¹

Principio de Ensayo

El análisis requiere una amplificación por PCR en tiempo real de un fragmento del exón X del gen que codifica para el FV de la coagulación humana. Sobre el producto de amplificación se detecta la presencia o ausencia de un cambio de base mediante sondas específicas utilizando la tecnología de PCR en tiempo real.

Introducción: Factor V

El Factor V es una glicoproteína de 300 Kd, codificada por el gen F5 que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 (locus 1q23) y está compuesto por 25 exones. La mutación conocida como Leiden se produce por sustitución de G por A en el nucleótido 1691 (G1691A), en el exón 10, lo que genera un reemplazo en el aminoácido 506 de la proteína de una Arginina (R) por una Glutamina (Q) (R506Q o alelo Q506). Esta posición es uno de los sitios de clivado por PCa (Proteína C activada) en el factor V normal. El cambio aminoacídico destruye el sitio natural de clivado y limita la degradación del Factor V. Funcionalmente resulta en una resistencia a la PCa, por lo que se pierde el efecto anticoagulante del FV activado. Para revisión ver 1 y 2.

¹. OMIM *227400 FACTOR V DEFICIENCY

². American College of Medical Genetics Consensus Statement on Factor V Leiden Mutation Testing .Wayne W. Grody et al.

(ACMG Factor V Leiden Working Group)

Presentación del kit

Color que identifica al kit:

El kit de ATGen para la detección de la mutación de Leiden incluye:


- 1 tubo FV Leiden Mezcla de Reacción (Tapa color amarillo).
- 1 tubo FV Control negativo, C-, (Tapa color transparente).
- 1 tubo FV Leiden ADN control positivo, (Tapa color rojo).

Todos los reactivos incluidos en el kit FV Leiden Real Time están en solución líquida. Los kits se comercializan en formato de 20 o 50 reacciones.

Materiales necesarios y no suministrados

Termociclador en tiempo Real.
Contenedor para descarte con bioseguridad.
Guantes y túnica.
Pipetas adecuadas.
Puntas de pipeta (tips) con filtro.
Tubos de PCR libres de ADN y ADNasa
Vortex.

Precauciones

5. Uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*.
6. Todas las muestras, reactivos y controles pueden tener potencialmente riesgo biológico. 
7. No utilizar después de la fecha de caducidad.
4. No sacar de forma simultánea tubos de diferentes cajas para evitar el intercambio de tubos de diferentes lotes.

Condiciones de almacenamiento

El Kit se conserva a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para asegurar un óptimo funcionamiento hasta la fecha de vencimiento impresa en el envase. El kit permite hasta 6 ciclos de descongelado, en caso de ser necesario realizar más descongelados, se recomienda alicuotar la mezcla de reacción en el primer descongelado.

Limitaciones e interferencias

El kit está diseñado para su utilización por personal capacitado en laboratorios que cuenten con instalaciones y equipos adecuados para ejecutar la técnica de PCR, siguiendo estrictamente las instrucciones de uso.

Las limitaciones e interferencias que pueden presentarse en el kits se pueden clasificar en 2 categorías:

1- Inhibición de la PCR

En todas las muestras problema analizadas debe registrarse curva de amplificación y curva de melt con picos discretos, independientemente del genotipo de la misma. De lo contrario debe suponerse un fallo por inhibición, o un error en la manipulación. El uso de técnicas de purificación de ADN a partir de sangre u otras muestras biológicas es un paso previo y esencial que influye directamente sobre el desempeño de los kits de PCR. Diversas sustancias presentes en las muestras biológicas como nucleasas, hemoglobina, heparina, etc., pueden interferir en la PCR. Empleando ADN con la pureza y concentración adecuadas se evitan las inhibiciones de la PCR y la obtención de resultados invalidados.

2- Mutaciones en la región blanco

El kit fue desarrollado para detectar y discriminar con alta especificidad el polimorfismo G1691A. La ocurrencia de mutaciones en la región de hibridación de las sondas fluorescentes pueden producir interferencias en la asignación de genotipos, por ejemplo desplazando la T_m más allá del valor permitido por las especificaciones. Estas mutaciones presentan muy baja frecuencia y en la población uruguaya no se ha reportado ningún caso.

En el caso de que se dieran las condiciones anteriores como mutaciones infrecuentes en la región blanco o inhibición de la PCR los resultados serían informados como indeterminados.

Características de la muestra

La muestra necesaria para realizar el diagnóstico es una solución de ADN con una concentración entre 150 y 200 ng / μ l, apta para amplificación por PCR.

ATGen recomienda el uso del kit ADN Fácil para muestras de sangre.

Instrucciones de uso

Zona de preamplificación:

Si es posible realizar todas las manipulaciones en frío.

Preparación de la mezcla para la amplificación:

- **Preparación de la mezcla de PCR:**

Descongelar la mezcla de reacción, evitando la exposición directa a la luz.

Homogeneizar la mezcla de reacción.

Preparación de la mezcla para la amplificación :

Colocar en la gradilla los tubos para PCR, se utilizaran un tubo por muestra a analizar mas 2 tubos correspondientes al control positivo y negativo.

Agregar 18 μ L de la mezcla de reacción en cada tubo y rotular.

Adicionar 2 μ L del ADN problema al tubo correspondiente.

Adicionar 2 μ L del ADN control positivo al tubo Control positivo.

Adicionar 2 μ L del control negativo al tubo Control negativo.

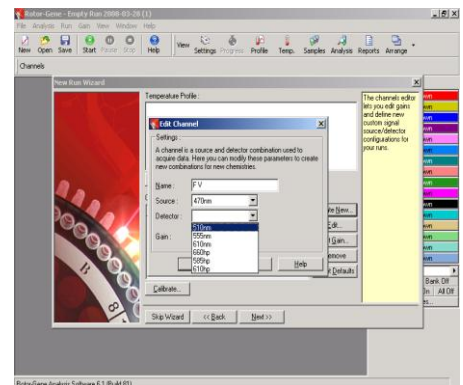
- **Programación del equipo:**

Colocar los tubos en el termociclador en tiempo real Rotor-Gene 3000.

NOTA: Si es la primera vez que programa el termociclador siga las siguientes instrucciones. De lo contrario pasar al punto 2.2.

- Abrir el programa y seleccionar la opción **Empty Run**. Seleccionar el botón **New**. En la siguiente ventana seleccionar el tipo de tubo a utilizar luego oprima **Next**.
- En la nueva ventana seleccione 20 μ l como volumen de reacción, y luego presione el botón **Next**.
- En la ventana **New Run Wizard** seleccione el botón **Create New** como se muestra en la figura. A continuación completar el cuadro con los siguientes datos. Luego seleccione **ok**.

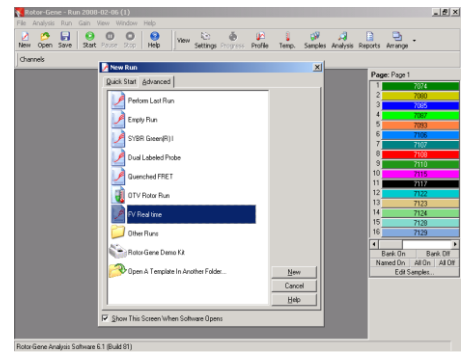
Name	FV
Source	470 nm
Detector	660 hp
Gain	10



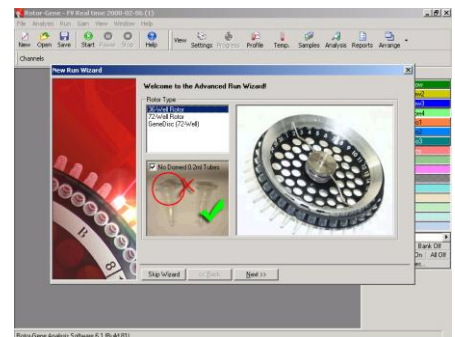
- Seleccione la botón **Edit Profile** e ingresar el ciclado con los datos de la siguiente tabla, y luego oprima **OK**

	Temp. C	Tiempo	Adquisición
Hold	95	3 min.	No
35 ciclos	95	15 seg	No
	54	20 seg	Canal FV
	72	10 seg	No
1 ciclo	95	15 seg	No
	40	60 seg	No
	50	60 seg	No
Melt	50 a 75	1°C/s	Canal FV

- En la siguiente ventana seleccione **Save Template** con el nombre **FV Real Time**. Nota. Esta opción le permitirá evitar los 2.1A a 2.1F en corridas posteriores. Luego seleccione el botón **Start Run** y continúe en el paso 3.1.

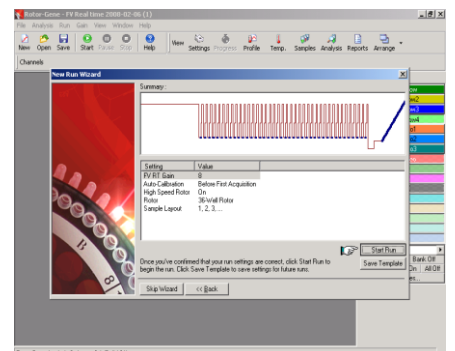


Iniciar el programa Rotor Gene dentro de la ventana **New Run** seleccionar **FV Real time**, luego seleccionar el botón **New**.



Seleccione el rotor de 36 posiciones y seleccione el tipo de tubos utilizados como se muestra en la figura. Luego seleccione **Next**.

Seleccione 20 µl en el volumen de reacción luego oprima **Next**.



El programa se actualizará mostrando la siguiente ventana, si desea verificar el programa de ciclado pase al punto 2.1.E de lo contrario oprima el botón **Start run**.

Guardar el archivo con el nombre deseado. Luego oprimir **Aceptar**.

Cargue los datos correspondientes a cada muestra. Para cerrar la ventana oprimir el botón **Finish**.

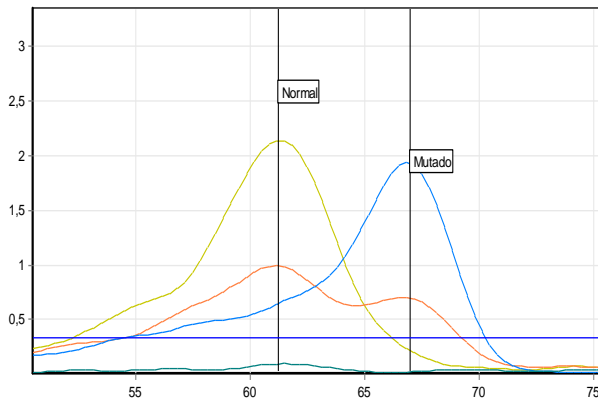
- **Obtención de los resultados:**

Una vez terminada la corrida seleccione el botón **Analysis** se abrirá una nueva ventana, seleccionar la pestaña **melt** luego seleccionar **Melt.FV Real Time** y oprimir el botón **Show**.

Seleccionar el umbral de intensidad siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- Determinar la intensidad de fluorescencia máxima del Control negativo, dicho valor no debe superar las 0,15 unidades de fluorescencia.
- Multiplicar el valor obtenido en el punto anterior por 3. El valor obtenido corresponde al umbral de fluorescencia, este valor permite validar todas aquellas muestras con picos por sobre este valor.

- Se observará una gráfica como la siguiente:



Línea amarilla: Muestra homocigota normal (pico: 61 °C).

Línea azul: Muestra homocigota mutado (pico: 66 °C).

Línea naranja: Muestra heterocigota (pico 61°C y pico 66°C).

- En la sección Peak bin (a la derecha de la pantalla) seleccionar la opción **New**.
- Seleccionar el pico de menor temperatura; se desplegará la ventana **Edit Bin**, completar la tabla con los datos a continuación. Luego seleccionar **Ok**

Name	Normal
Position	61
Width (Degrees)	0,5

- Repetir desde el paso 3.2 y 3.3, con el pico de mayor temperatura y los siguientes datos.

Name	Mutado
Position	66
Width (Degrees)	0,5

- Seleccionar el botón Genotypes y completar la tabla con los siguientes datos.

Homocigota Normal	NN	Bin A	-
Heterocigota	MM	Bin A	Bin B
Homocigota mutado	NM	-	Bin B

- **Validación de los resultados:**

El valor de fluorescencia del pico mutado del control positivo debe ser mayor a 0,45 unidades de fluorescencia.

Se considerarán únicamente los picos que superen 3 veces la señal del control negativo (normalmente <0,15).

En el caso de obtener muestras heterocigotas se recomienda chequear que las intensidad de ambos picos no superen una relación de 2:1 (Normal:Mutado).

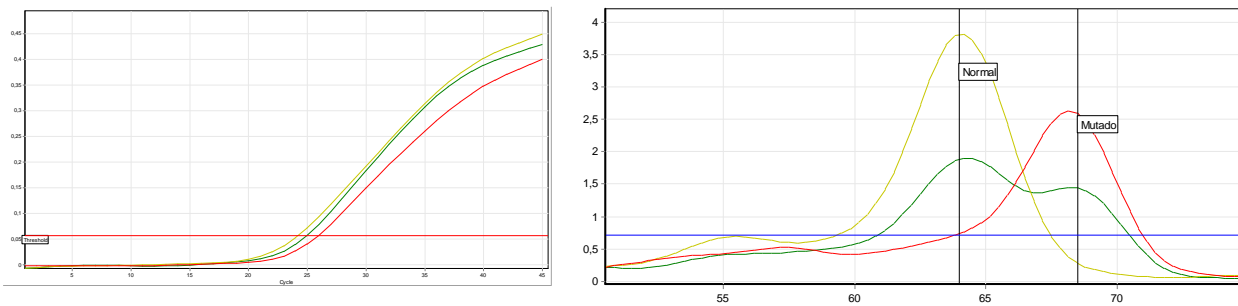
Bibliografía:

- 4) OMIM *227400 FACTOR V DEFICIENCY
- 5) American College of Medical Genetics Consensus Statement on Factor V Leiden Mutation Testing .Wayne W. Grody et al. (ACMG Factor V Leiden Working Group)



MTHFR (C677T) Real Time (RG)

Sistema para detección, por PCR en tiempo real, para la mutación puntual denominada C677T.



Reg. MSP 45179

Versión 4
Aprobada: 14/10/10

Valdense 3616. 11700. Montevideo. Uruguay.
Teléfono (598) 2 336 83 01.
Fax (598) 2 336 71 60.
Info@atgen.com.uy
www.atgen.com.uy

Uso exclusivo en investigación.

Los resultados del test sólo pueden ser utilizados para análisis preliminar.

La compra de este producto no incluye ni proporciona una licencia para llevar a cabo aplicaciones patentadas.

Utilidad del Kit

El kit de ATGen analiza un polimorfismo puntual que involucra un cambio de citosina por timina en la posición 677 (C677T) en el exón 4 del gen que codifica para la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa. Esta alteración se traduce en un cambio alanina por valina en el aminoácido 222 de la proteína.

Principio de Ensayo

El análisis requiere la amplificación por PCR en tiempo real, de un fragmento del gen que codifica para la MTHFR humana sobre el que se detecta la presencia o ausencia de un cambio de base mediante sondas específicas.

Introducción: MTHFR

El gen de la MTHFR se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1 en la región 1p36.3. La enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) cataliza la reducción del 5,10 metileno tetrahidrofolato (THF) a 5-metilTHF, la forma primaria de folato sérico co-sustrato para la remetilación de homocisteína a metionina.

El cambio de citosina por timina en la posición 677 (C677T) del gen que codifica para la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa produce una versión termolábil de la enzima que presenta menor actividad, influyendo los niveles séricos de homocisteína.

Un segundo polimorfismo genético en la MTHFR denominado A1298C (ATGen A1298C) también disminuye la actividad de esta enzima. Para revisión ver Bibliografía al final de este protocolo.

Presentación del kit

Color que identifica al kit : Azul

El kit de ATGen para la detección de la alteración MTHFR C677T incluye:

- 1 tubo MTHFR C677T Mezcla de Reacción.
- 1 tubo MTHFR C677T ADN control positivo, C+.
- 1 tubo MTHFR C677T control negativo, C-.

Todos los reactivos incluidos en el kit MTHFR C677T están en solución líquida. Los kits se comercializan en formato de 20 o 50 reacciones.

Materiales necesarios y no suministrados

Contenedor para descarte con bioseguridad.

Guantes y túnica.

Pipetas adecuadas.


Puntas de pipeta (tips) con filtro.

Termociclador en tiempo real.

Tubos de PCR libres de ADN y ADNasa.

Vortex.

Precauciones

- Uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*.
 - Todas las muestras, reactivos y controles pueden tener potencialmente riesgo biológico. 
 - No utilizar después de la fecha de caducidad.
4. No sacar de forma simultánea tubos de diferentes cajas para evitar el intercambio de tubos de diferentes lotes.

Condiciones de almacenamiento

El Kit se conserva a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para asegurar un óptimo funcionamiento hasta la fecha de vencimiento impresa en el envase.

Limitaciones e interferencias

El kit está diseñado para su utilización por personal capacitado en laboratorios que cuenten con instalaciones y equipos adecuados para ejecutar la técnica de PCR, siguiendo estrictamente las instrucciones de uso.

Las limitaciones e interferencias que pueden presentarse en el kits se pueden clasificar en 2 categorías:

1- Inhibición de la PCR

En todas las muestras problema analizadas debe registrarse curva de amplificación y curva de melt con picos discretos, independientemente del genotipo de la misma. De lo contrario debe suponerse un fallo por inhibición, o un error en la manipulación. El uso de técnicas de purificación de ADN a partir de sangre u otras muestras biológicas es un paso previo y esencial que influye directamente sobre el desempeño de los kits de PCR. Diversas sustancias presentes en las muestras biológicas como nucleasas, hemoglobina, heparina, etc., pueden interferir en la PCR. Empleando ADN con la pureza y concentración adecuadas se evitan las inhibiciones de la PCR y la obtención de resultados invalidados.

2- Mutaciones en la región blanco

El kit fue desarrollado para detectar y discriminar con alta especificidad el polimorfismo C677T. La ocurrencia de mutaciones en la región de hibridación de las sondas fluorescentes pueden producir interferencias en la asignación de genotipos, por ejemplo desplazando la T_m más allá del valor permitido por las especificaciones. Estas mutaciones presentan muy baja frecuencia y en la población uruguaya no se ha reportado ningún caso. En nuestro laboratorio se han analizado más de 2500 muestras para la mutación C677T; a la fecha no se han reportado interferencias en la región de hibridación de la sonda.

En el caso de que se dieran las condiciones anteriores como mutaciones infrecuentes en la región blanco o inhibición de la PCR los resultados serian informados como indeterminados.

Características de la muestra

La muestra necesaria para realizar el diagnóstico es una solución de ADN con una concentración entre 150 y 200 ng / μ l, apta para amplificación por PCR.

ATGen recomienda el uso del kit ADN Fácil para muestras de sangre.

Instrucciones de uso

Zona de preamplificación:

Si es posible realizar todas las manipulaciones en frío y con la menor incidencia de la luz.

Preparación de la mezcla para la amplificación:

6) Preparación de la mezcla de PCR:

- 7) Descongelar la mezcla de reacción, evitando la exposición directa a la luz.
- 8) Homogenizar la mezcla de reacción.
- 9) Preparación de la mezcla para la amplificación:

Colocar en la gradilla los tubos para PCR, se utilizarán un tubo por muestra a analizar más 2 tubos correspondientes al control positivo y control negativo.

Agregar 18 μL de la mezcla de reacción en cada tubo y rotular.

Adicionar 2 μL del ADN problema al tubo correspondiente.

Adicionar 2 μL del ADN control positivo al tubo Control positivo.

Adicionar 2 μL del control negativo al tubo Control negativo.

Cerrar los tubos y pasar a la siguiente etapa.

10) Programación del equipo:

- 11) Colocar los tubos en el termociclador en tiempo real Rotor-Gene 3000.

NOTA: Si es la primera vez que programa el termociclador siga las siguientes instrucciones. De lo contrario pasar al punto 2.2.

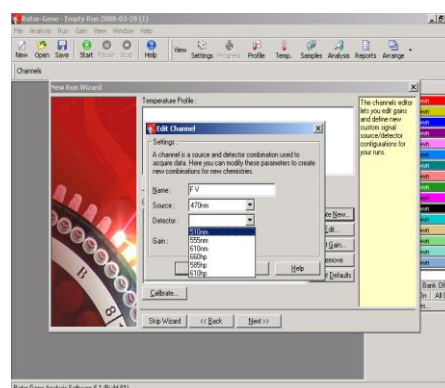
Abrir el programa y seleccionar la opción **Empty Run**. Seleccionar el botón **New**. En la siguiente ventana seleccionar el tipo de tubo a utilizar luego oprima **Next**.

En la nueva ventana seleccione 20 μL como volumen de reacción, y luego presione el botón **Next**.

- En la ventana **New Run Wizard** seleccione el botón **Create New** como se muestra en la figura. A continuación completar el cuadro con los siguientes datos. Luego seleccione **ok**.

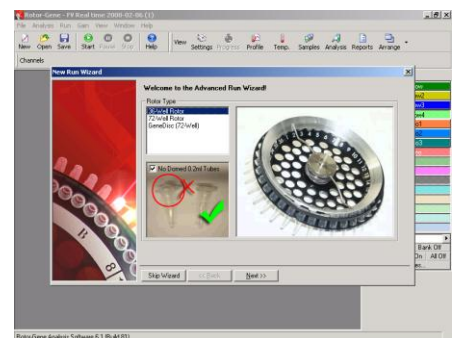
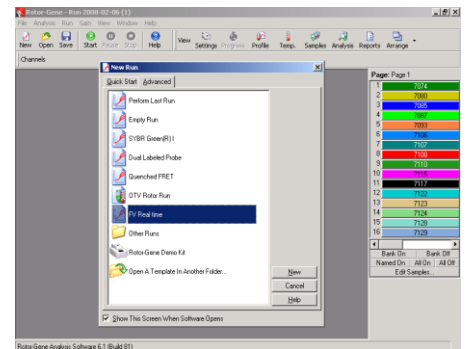
Name	MTHFR
Source	470 nm
Detector	660 hp

Seleccione la botón **Edit Profile** e ingresar el ciclado con los datos de la siguiente tabla, y luego oprima **OK**



En la siguiente ventana seleccione **Save Template** con el nombre deseado (ej. **MTHFR Real Time**). Nota. Esta opción le permitirá evitar los 2.1A a 2.1F en corridas posteriores. Luego seleccione el botón **Start Run** y continúe en el paso 3.1.

	Temp. C	Tiempo	Adquisición
Hold	95	3 min.	No
40 ciclos	95	15 seg	No
	56	20 seg	Canal MTHFR
	72	10 seg	No
1 ciclo	95	15 seg	No
	45	60 seg	No
Melt	45 a 85	1 °C/s	Canal MTHFR

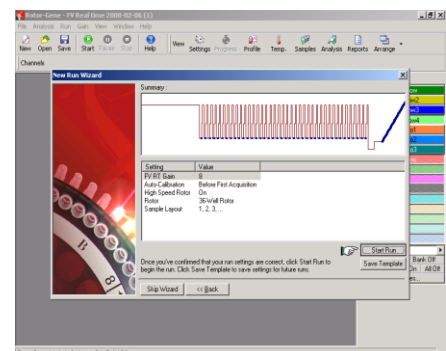


12) Iniciar el programa Rotor Gene, dentro de la ventana **New Run** seleccionar **MTHFR Real time**, luego seleccionar el botón **New**.

13) Seleccione el rotor de 36 posiciones y seleccione el tipo de tubos utilizados como se muestra en la figura. Luego seleccione **Next**.

14) Seleccione 20 µl en el volumen de reacción luego oprima **Next**.

15) El programa se actualizara mostrando la siguiente ventana, si desea verificar el programa de ciclado



pase al punto 2.1.E de lo contrario oprima el botón **Start run**.

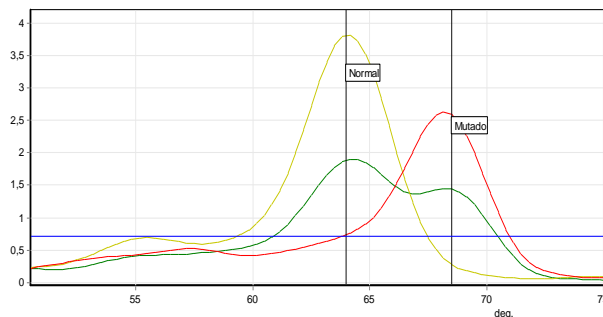
16) Guardar el archivo con el nombre deseado. Luego oprimir **Aceptar**.

17) Cargue los datos correspondientes a cada muestra. Para cerrar la ventana oprimir el botón **Finish**.

18) Obtención de los resultados:

19) Una vez terminada la corrida seleccione el botón **Analysis** se abrirá una nueva ventana, seleccionar la pestaña **melt** luego seleccionar **Melt.MTHFR Real Time** y oprimir el botón **Show**.

20) Se observará una gráfica como la siguiente:



Línea amarilla: Muestra homocigota normal (pico: 59 °C).

Línea roja: Muestra homocigota mutado (pico: 66 °C).

Línea verde: Muestra heterocigota (pico 59°C y pico 66°C).

21) Seleccionar el umbral de intensidad siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- Determinar la intensidad de fluorescencia máxima del Control negativo, dicho valor no debe superar las 0,15 unidades de fluorescencia.
- Multiplicar el valor obtenido en el punto anterior por 3. El valor obtenido corresponde al umbral de fluorescencia, este valor permite validar todas aquellas muestras con picos por sobre este valor.

22) En la sección Peak bin (a la derecha de la pantalla) seleccionar la opción **New**.

23) Seleccionar el pico de menor temperatura; se desplegará la ventana **Edit Bin**, completar la tabla con los datos a continuación. Luego seleccionar **Ok**

Name	Normal
Position	59
Width (Degrees)	2

24) Repetir desde el paso 3.4 y 3.5, con el pico de mayor temperatura y los siguientes datos.

Name	Mutado
Position	66
Width (Degrees)	2

25) Seleccionar el botón **Genotypes** y completar la tabla con los siguientes datos.

26) Validación de los resultados:

- 27) El valor de fluorescencia del pico mutado del control positivo debe ser mayor a 0,45 unidades de fluorescencia.
- 28) Se considerarán únicamente los picos que superen 3 veces la señal del control negativo (normalmente <0,15).
- 29) En el caso de obtener muestras heterocigotas se recomienda chequear que las intensidad de ambos picos no superen una relación de 2:1 (Normal:Mutado).

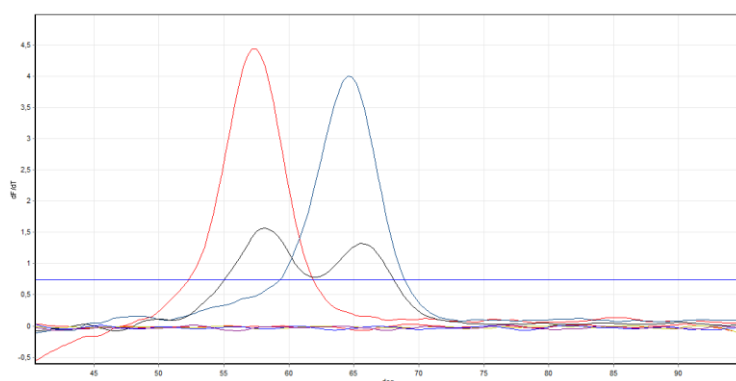
Bibliografía:

Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gen variants and congenital anomalies: a HuGE review. Am J Epidemiol 2000;151:862-77.
OMIM, 607093 5,10-@METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE; MTHFR



Factor II Real Time (RG)

Sistema para detección, por PCR en tiempo real, de la alteración G20210A en el gene que codifica para el Factor II de la coagulación humana.



Reg. MSP 45180

Versión 4
Aprobada: 14/10/10

Valdense 3616. 11700. Montevideo. Uruguay.
Teléfono (598) 2 336 83 01.
Fax (598) 2 336 71 60.
Info@atgen.com.uy
www.atgen.com.uy

Uso exclusivo en investigación.

Los resultados del test sólo pueden ser utilizados para análisis preliminar.

La compra de este producto no incluye ni proporciona una licencia para llevar a cabo aplicaciones patentadas.

Utilidad del Kit

El kit de ATGen analiza un polimorfismo puntual que involucra un cambio de guanina por adenina en el nucleótido 20210 (G20210A) de la región 3'UT del gene que codifica para el Factor II de la coagulación humana.

Principio de Ensayo

El análisis requiere una amplificación por PCR en tiempo real del segmento 3'UT del gen de la protrombina que contiene el sitio polimórfico. La detección de la mutación del factor II involucra una amplificación por PCR en tiempo real seguido de curvas de desnaturalización del producto amplificado.

Introducción: Factor II

El gen de la protrombina humana (Factor II) se encuentra en el cromosoma 11 en la región 11p11.2 y contiene 622 aa. La mutación FII 20210G-A genera una ganancia de función con acumulación de ARNm y síntesis de la proteína que explicaría la patogénesis de la trombofilia.²

²1. OMIM*176930 COAGULATION FACTOR II; F2

2 Poort, S. R.; Rosendaal, F. R.; Reitsma, P. H.; Bertina, R. M. : **A common genetic variation in the 3-prime-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis.** *Blood* 88: 3698-3703, 1996.

3 Gehring, N. H.; Frede, U.; Neu-Yilik, G.; Hundsdoerfer, P.; Vetter, B.; Hentze, M. W.; Kulozik, A. E. : **Increased efficiency of mRNA 3-prime end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia.** *Nature Genet.* 28: 389-392, 2001.

Presentación del kit

Color que identifica al kit:

El kit de ATGen para la detección de la mutación incluye:


- 1 tubo FII Mezcla de Reacción (Tapa color ambar).
- 1 tubo FII Control negativo, C-, (Tapa color transparente).
- 1 tubo FII con ADN control positivo, (Tapa color rojo).

Todos los reactivos incluidos en el kit FII Real Time están en solución líquida. Los kits se comercializan en formato de 20 o 50 reacciones.

Materiales necesarios y no suministrados

- Termociclador en tiempo Real.
- Contenedor para descarte con bioseguridad.
- Guantes y túnica.
- Pipetas adecuadas.
- Puntas de pipeta (tips) con filtro.
- Tubos de PCR libres de ADN y ADNasa
- Vortex.

Precauciones

- Uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*.
 - Todas las muestras, reactivos y controles pueden tener potencialmente riesgo biológico. 
 - No utilizar después de la fecha de caducidad.
4. No sacar de forma simultánea tubos de diferentes cajas para evitar el intercambio de tubos de diferentes lotes.

Condiciones de almacenamiento

El Kit se conserva a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para asegurar un óptimo funcionamiento hasta la fecha de vencimiento impresa en el envase. El kit permite hasta 6 ciclos de descongelado, en caso de ser necesario realizar más descongelados, se recomienda alicuotar la mezcla de reacción en el primer descongelado.

Limitaciones e interferencias

El kit está diseñado para su utilización por personal capacitado en laboratorios que cuenten con instalaciones y equipos adecuados para ejecutar la técnica de PCR, siguiendo estrictamente las instrucciones de uso.

Las limitaciones e interferencias que pueden presentarse en el kits se pueden clasificar en 2 categorías:

1- Inhibición de la PCR

En todas las muestras problema analizadas debe registrarse curva de amplificación y curva de melt con picos discretos, independientemente del genotipo de la misma. De lo contrario debe suponerse un fallo por inhibición, o un error en la manipulación. El uso de técnicas de purificación de ADN a partir de sangre u otras muestras biológicas es un paso previo y esencial que influye directamente sobre el desempeño de los kits de PCR. Diversas sustancias presentes en las muestras biológicas como nucleasas, hemoglobina, heparina, etc., pueden interferir en la PCR. Empleando ADN con la pureza y concentración adecuadas se evitan las inhibiciones de la PCR y la obtención de resultados invalidados.

2- Mutaciones en la región blanco

El kit fue desarrollado para detectar y discriminar con alta especificidad el polimorfismo G20210A. La ocurrencia de mutaciones en la región de hibridación de las sondas fluorescentes pueden producir interferencias en la asignación de genotipos, por ejemplo desplazando la Tm más allá del valor permitido por las especificaciones. Estas mutaciones presentan muy baja frecuencia y en la población uruguaya no se ha reportado ningún caso. En nuestro laboratorio se han analizado más de 1000 muestras para la mutación G20210A y a la fecha no se han reportado interferencias en la región de hibridación de la sonda.

En el caso de que se dieran las condiciones anteriores como mutaciones infrecuentes en la región blanco o inhibición de la PCR los resultados serían informados como indeterminados.

Características de la muestra

La muestra necesaria para realizar el diagnóstico es una solución de ADN con una concentración entre 150 y 200 ng / μ l, apta para amplificación por PCR.

ATGen recomienda el uso del kit ADN Fácil para muestras de sangre.

Instrucciones de uso

Zona de preamplificación:

Si es posible realizar todas las manipulaciones en frío.

Preparación de la mezcla para la amplificación:

30) Preparación de la mezcla de PCR:

31) Descongelar la mezcla de reacción, evitando la exposición directa a la luz.

32) Homogeneizar la mezcla de reacción.

33) Preparación de la mezcla para la amplificación :

- Colocar en la gradilla los tubos para PCR, se utilizaran un tubo por muestra a analizar más 2 tubos correspondientes al control positivo y negativo.
- Agregar 18 μL de la mezcla de reacción en cada tubo y rotular.
- Adicionar 2 μL del ADN problema al tubo correspondiente.
- Adicionar 2 μL del ADN control positivo al tubo Control positivo.
- Adicionar 2 μL del control negativo al tubo Control negativo.

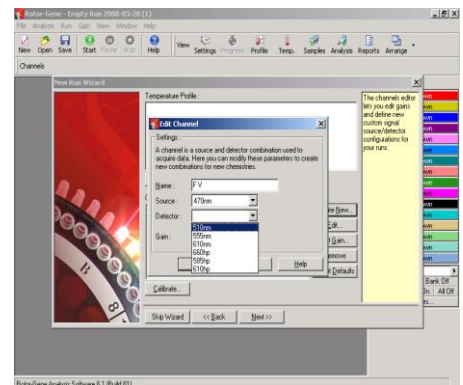
34) Programación del equipo:

35) Colocar los tubos en el termociclador en tiempo real Rotor-Gene 3000.

NOTA: Si es la primera vez que programa el termociclador siga las siguientes instrucciones. De lo contrario pasar al punto 2.2.

- Abrir el programa y seleccionar la opción **Empty Run**. Seleccionar el botón **New**. En la siguiente ventana seleccionar el tipo de tubo a utilizar luego oprima **Next**.
- En la nueva ventana seleccione 20 μl como volumen de reacción, y luego presione el botón **Next**.
- En la ventana **New Run Wizard** seleccione el botón **Create New** como se muestra en la figura. A continuación completar el cuadro con los siguientes datos. Luego seleccione **ok**.

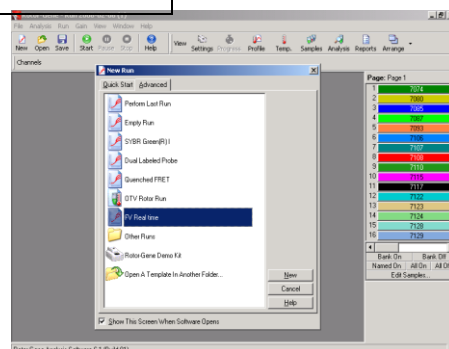
Name	FII
Source	470 nm
Detector	660 hp
Gain	10



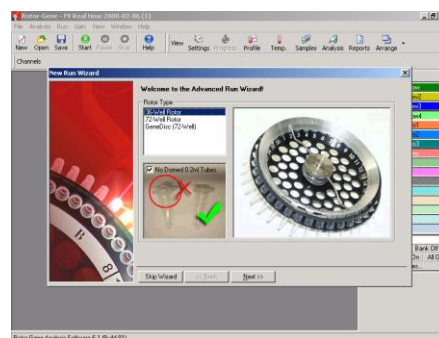
- Seleccione la botón **Edit Profile** e ingresar el ciclado con los datos de la siguiente tabla, y luego oprima **OK**

	Temp. C	Tiempo	Adquisición
Hold	95	3 min.	No
40 ciclos	95	15 seg	No
	56	20 seg	Canal FII
	72	10 seg	No
1 ciclo	95	15 seg	No
	40	60 seg	No
Melt	40 a 85	1°C/s	Canal FII

En la siguiente ventana seleccione Save Template con el nombre FII Real Time. Nota. Esta opción le permitirá evitar los 2.1A a 2.1F en corridas posteriores. Luego seleccione el botón Start Run y continúe en el paso 3.1.



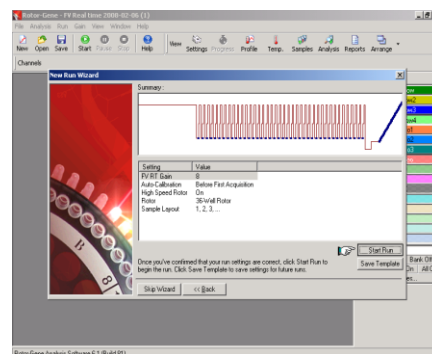
Al iniciar el programa Rotor Gene dentro de la ventana **New Run** seleccionar **FII Real time**, luego seleccionar el botón **New**.



Seleccione el rotor de 36 posiciones y seleccione el tipo de tubos utilizados como se muestra en la figura. Luego seleccione **Next**.

Seleccione 20 µl en el volumen de reacción luego oprima **Next**.

El programa se actualizara mostrando la siguiente ventana, si desea verificar el programa de ciclado pase al punto 2.1.E de lo contrario oprima el botón **Start run**.



36) Guardar el archivo con el nombre deseado. Luego oprimir **Aceptar**.

37) Cargue los datos correspondientes a cada muestra. Para cerrar la ventana oprimir el botón **Finish**.

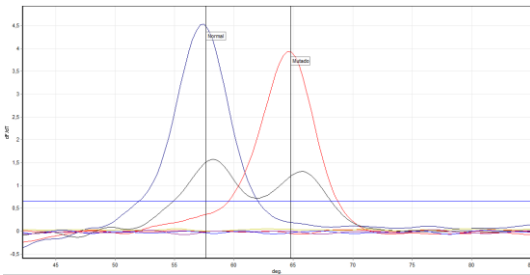
38) Obtención de los resultados:

Una vez terminada la corrida seleccione el botón **Analysis** se abrirá una nueva ventana, seleccionar la pestaña **melt** luego seleccionar **Melt.FII Real Time** y oprimir el botón **Show**.

39) Seleccionar el umbral de intensidad siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- Determinar la intensidad de fluorescencia máxima del Control negativo, dicho valor no debe superar las 0,15 unidades de fluorescencia.
- Multiplicar el valor obtenido en el punto anterior por 3. El valor obtenido corresponde al umbral de fluorescencia, este valor permite validar todas aquellas muestras con picos por sobre este valor.

40) Se observará una gráfica como la siguiente:



Línea azul: Muestra homocigota normal (pico: 56 °C).

Línea : Muestra homocigota mutado (pico: 65 °C).

Línea negra: Muestra heterocigota (pico 56°C y pico 65°C).

En la sección Peak bin (a la derecha de la pantalla) seleccionar la opción **New**. Seleccionar el pico de menor temperatura; se desplegará la ventana **Edit Bin**, completar la tabla con los datos a continuación. Luego seleccionar **Ok**

Name	Normal
Position	56
Width (Degrees)	0,5

41) Repetir desde el paso 3.2 y 3.3, con el pico de mayor temperatura y los siguientes datos.

Name	Mutado
Position	65
Width (Degrees)	0,5

42) Seleccionar el botón Genotypes y completar la tabla con los siguientes datos.

Homocigota Normal	NN	Bin A	-
Heterocigota	MM	Bin A	Bin B
Homocigota mutado	NM	-	Bin B

43) Validación de los resultados:

- 44) El valor de fluorescencia del pico mutado del control positivo debe ser mayor a 0,45 unidades de fluorescencia.
- 45) Se considerarán únicamente los picos que superen 3 veces la señal del control negativo (normalmente <0,15).
- 46) En el caso de obtener muestras heterocigotas se recomienda chequear que las intensidad de ambos picos no superen una relación de 2:1 (Normal:Mutado).

Bibliografía:

OMIM*176930 COAGULATION FACTOR II; F2
oort, S. R.; Rosendaal, F. R.; Reitsma, P. H.; Bertina, R. M.: A common genetic variation in the 3-prime-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88: 3698-3703, 1996.

Gehring, N. H.; Frede, U.; Neu-Yilik, G.; Hundsdorfer, P.; Vetter, B.; Hentze, M. W.; Kulozik, A. E. : Increased efficiency of mRNA 3-prime end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nature Genet.* 28: 389-392, 2001.

**ANEXO 3 – cotización de diseñadores industriales para
cajas de cartón**

Presupuesto

Artículo: Contenedor para tubos de ensayo (6/8/10)
Nichos para tubos de ensayo
Manual de instrucciones

Alcances del Proyecto

Nivel Conceptual

Análisis de requerimientos: formales, ergonómicos, resistencia mecánica y física, comunicativos, transporte, situación de uso y no uso, comerciales.

Propuesta conceptual: desarrollo de propuestas que se evaluarán para seleccionar la propuesta final (entre 2 y 4).

Desarrollo de producto: propuesta formal, funcional, materiales (experimentación y elección), texturas.

Diseño de gráfica exterior/interior, aplicación de marca, aplicación de información.

Nivel Ejecutivo

Bocetos y/o render

Modelo de control y/o prototipo

Presupuesto de proveedor (entre uno y dos presupuestos)

Plano de troquel de corte

Original gráfico para imprenta

Tiempo aproximado del proyecto: un mes

Costo del proyecto: \$17.600

Cronograma de actividades y pagos

Pagos

Primer pago: 30% al comenzar el proyecto
Segundo pago: 30% al finalizar la segunda etapa
Tercer pago: 40% contra entrega del trabajo terminado

Actividades

Primer etapa

Actividad: Generación de conceptos
Bocetos y/o renders
Primeros modelos de control
Análisis de materiales

Tiempo aproximado: 10 días

Segunda etapa

Actividad: Desarrollo de producto (forma, función, materiales)
Modelo de control
Diseño de gráfica y su aplicación
Corrección de la primer etapa

Tiempo aproximado: 13 días

Tercer etapa

Actividad: Prototipo
Troquel de corte
Original gráfico para imprenta
Corrección de la segunda etapa

Tiempo aproximado: 7 días

*Al final de cada etapa se realiza una reunión para ver los adelantos y hacer las correcciones necesarias.

609

comunicación visual para emprendimientos de arquitectura

Presupuesto: Diseño kit pcr real time.
Cliente: ATGen
Ref: 02-05-08

Descripción de la propuesta:

Se diseñará isologotipo para kits de diagnóstico de factor V, factor II y metilhidrotetrafolioreductasa, acompañado de las aplicaciones correspondientes: papelería, tarjetones de venta y empaque. La gráfica apuntará a reflejar, a través de una estética innovadora, la nueva tecnología PCR REAL TIME que se está promocionando. El empaque, tanto en materiales como en forma, atenderá los requerimientos de funcionalidad del procedimiento de laboratorio, así como los de almacenamiento y distribución del producto.

Honorarios

Los honorarios profesionales por la realización de este proyecto:.....13.000 Pesos Uruguayos

Condiciones de pago

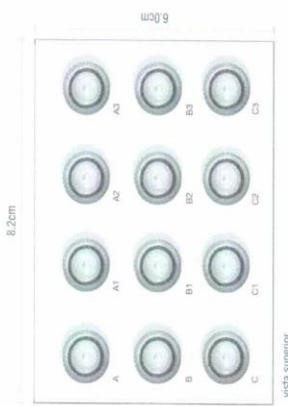
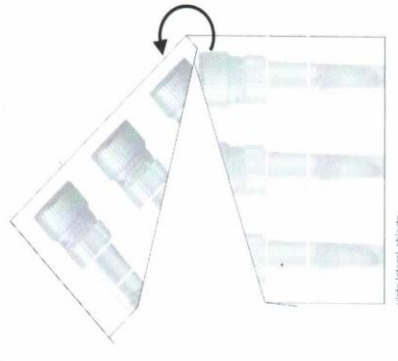
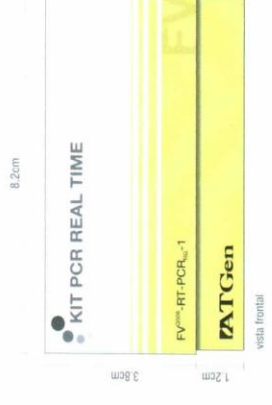
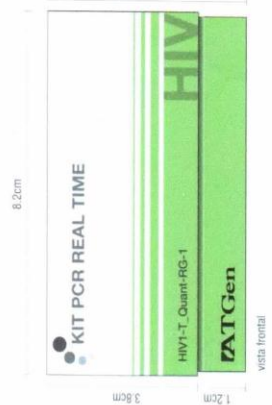
30% aceptado el presupuesto
30% aceptado el primer prototipo de diseño
40% al momento de la entrega definitiva

Este presupuesto no incluye impuestos.

Este presupuesto está basado en el alcance descrito en este documento. En caso de variar las condiciones acordadas se procederá a realizar el ajuste de honorarios correspondiente.

Agradecemos la oportunidad para ofrecer nuestros servicios quedando a su disposición para aclarar o ampliar cualquier aspecto que estimen conveniente.

Arq Gimena Rilo Salhón
cel ++598 98 659 622
gimena@gog.com.uy



ANEXO 4 – Publicaciones asociadas
