

Introducción de la PCR en tiempo real para el diagnóstico de las trombofilias hereditarias

Martínez-Echevarría MT, Casanueva-Calero K, González-García N, Cepero-Llauger K
Hospital Clínico Quirúrgico. “Hermanos Ameijeiras”, La Habana, Cuba.
Email: genetica@hha.sld.cu

RESUMEN

Las trombofilias hereditarias son una entidad que habitualmente se diagnóstica mediante PCR-RFLP, técnica muy engorrosa que demora la entrega del resultado. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) es una variante optimizada de la PCR que usa sondas marcadas con fluoróforos. El presente trabajo tiene como objetivo introducir dicha técnica para el diagnóstico de estas patologías. En el Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”. Se estudiaron 111 muestras de ADN de adultos jóvenes con antecedentes de trastornos de la coagulación. Las mutaciones G1691A factor V, G20210A factor II, V34L factor XIII A, así como los polimorfismos C677T y A1298C de la enzima Metilen Tetrahidrofolato Reductasa (mthfr) se detectaron mediante PCR-TR utilizando estuches diagnósticos de tibmolbiol en un termociclador LightCycler 96 (ROCHE). La mutación G1691A factor V se encontró en 4 pacientes, la G20210A factor II en 3, la V34L factor XIII A en 3 y de los polimorfismos estudiados solo se encontró el A1298C en 5 pacientes. Este método, evaluado por vez primera en Cuba, permitió acortar el tiempo de respuesta al paciente y ampliar el estudio molecular de las trombofilias hereditarias al brindar un mejor diagnóstico de dichas patologías.

Palabras clave: trombofilia, diagnóstico, factor V de Leiden, factor II, factor XIII, metilen tetrahidrofolato reductasa.

INTRODUCCIÓN



Se habla de trombofilia cuando existe alteración en el sistema de la hemostasia, que predispone a la trombosis. Es primaria cuando está presente a nivel familiar (hereditaria) o secundaria, cuando se asocia a un factor de riesgo adquirido, que puede ser transitorio o permanente, comúnmente asociado a otra enfermedad de base. El sistema de la hemostasia requiere de la acción cooperativa y equilibrada del sistema vascular, la función plaquetaria y el sistema de la coagulación y fibrinolítico, todos ellos controlados por un sistema de vigilancia que incluye a los anticoagulantes fisiológicos, la antitrombina y el sistema de la proteína C.¹

Cuando un paciente sufre una trombosis estos factores deben ser estudiados con el fin de caracterizar el evento y definir su causa. Desafortunadamente, no existe un simple método de laboratorio para la identificación y caracterización de las trombofilias. Por lo tanto, se hace necesario realizar una amplia y compleja batería de pruebas que resulta muy costosa, especialmente las moleculares. Estas determinaciones solo deben hacerse si el análisis del resto de los complementarios arroja indicios de una posible mutación y si sus resultados implican un cambio en el manejo del paciente.^{2,3}

El diagnóstico de las trombofilias hereditarias comenzó en Cuba, en el Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras, mediante el empleo del PCR-RFLP para la detección de las mutaciones puntuales (SNP, *del inglés single nucleotide polymorphisms*) factor V G1691A y factor II G20210A. Estas técnicas requieren de un procesamiento largo y complejo, por lo que no permiten el análisis de grandes cantidades de muestras y la entrega del resultado es demorada. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) es una variante optimizada de la PCR que usa sondas de hidrólisis marcadas con fluoróforos para la detección de la mutación, en un proceso de tan sólo tres pasos, incluyendo el análisis de la temperatura de fusión (*Tm del inglés melting temperature*) para la emisión del resultado final.⁴

OBJETIVO

Introducir el PCR-TR para la determinación de las mutaciones factor V G1691A, factor II G20210A, factor XIII A V34L, así como de los polimorfismos mthfr C677T y mthfr A1298C para el diagnóstico de los trastornos de la coagulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en el período comprendido entre julio y diciembre de 2016.

La muestra quedó constituida por 111 adultos jóvenes con sintomatología, clínica y antecedentes familiares de trastornos en la coagulación, remitidos al laboratorio de Genética Molecular del Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras por el servicio de Hematología, durante el período comprendido entre julio y diciembre de 2016.

Método de PCR: La extracción del ADN se realizó a partir de sangre total mediante el estuche comercial High Pure Template Preparation Kit (ROCHE), siguiendo las normas del fabricante. El ADN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop TM One y a continuación, teniendo en cuenta los datos clínicos del paciente, los antecedentes patológicos familiares y la solicitud del hematólogo, se amplificaron los fragmentos de interés con los estuches comerciales LightMix® in-vitro diagnostics kit Factor V (Leiden), LightMix® in-vitro diagnostics kit Factor II G20210A, LightMix® in-vitro diagnostics kit Factor XIII A V34L, LightMix® in-vitro diagnostics kit MTHFR A1298C, LightMix® in-vitro diagnostics kit MTHFR C677T de tibi molbiol en un termociclador LightCycler 96 (ROCHE),

RESULTADOS

Los métodos de PCR-TR evaluados resultaron ser mucho más sensibles ya que requieren sólo de 5 a 100 ng/μL de ADN, mientras que los métodos de PCR-RFLP requieren de 200 a 500 ng/μL, lo que, implica el procesamiento de un mayor volumen de sangre. El PCR-TR también es mucho más específico debido al empleo de sondas de hidrólisis para el tipaje del SNP.

Desde el punto de vista técnico, el PCR-TR es mucho más sencillo dado que se realiza en tres pasos: extracción del ADN, amplificación del segmento de interés y detección del SNP mediante PCR y análisis de los resultados, los cuales pueden realizarse en uno o dos días con un mínimo de manipulación, lo que minimizó los errores de manipulación y redujo el riesgo de contaminación del laboratorio y de exposición del investigador a los agentes químicos y físicos, ya que el proceso transcurre en viales cerrados. Y nos permitió, además, acortar el plazo de entrega de resultados y ampliar la batería de pruebas moleculares para abordar los trastornos de la coagulación. No obstante, estas determinaciones tienen la desventaja de ser altamente costosas por lo que su empleo debe ser racional.

De las muestras empleadas para la introducción del PCR-TR, 102 eran de pacientes con trombofilia por lo que se les realizó la detección de la mutación G1691A factor V por ser el SNP más frecuente en estos pacientes a nivel mundial. A partir del análisis del resultado obtenido, de los datos clínicos y de la historia familiar, se determinó en qué casos debía continuarse el estudio con la determinación de las mutaciones G20210A factor II, C677T mthfr y A1298C mthfr, ya que el manejo del paciente es el mismo tanto para los que portan una de estas mutaciones, como para los que portan una combinación de ellas. La mutación G1691A factor V se encontró en 4 de los 102 pacientes estudiados, la G20210A factor II en 3 de 48 y la mthfr A1298C en 5 de 9, mientras que la mthfr C677T no se detectó en ninguno de los 9 pacientes estudiados. La determinación de la mutación A V34L factor XIII se realizó en 9 pacientes con tendencia al sangramiento, encontrándose presente en tres de ellos.

CONCLUSIONES

El método, evaluado por vez primera en Cuba, permitió acortar el tiempo de respuesta al paciente y ampliar el estudio molecular de las trombofilias hereditarias y brindar un mejor diagnóstico de dichas enfermedades.

RECOMENDACIONES

Sustituir el PCR-RFLP por el PCR-TR para el estudio de las trombofilias hereditarias en Cuba.

Realizar la solicitud del estudio molecular de forma racional, basada en las evidencias clínicas y en los antecedentes familiares del paciente.

Realizar estudios poblacionales para determinar la frecuencia de estas mutaciones en la población cubana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mannucci PM, Franchini M. The real value of thrombophilia markers in identifying patients at high risk of venous thromboembolism. *Exp Rev Hematol.* 2014;7(6):757-65.
2. Schellong SM. Importance of thrombophilia screening. *Der Internist.* 2014; 55(5):529-30, 32-4, 36.
3. Graham N, Rashed H, Hunt BJ. Testing for thrombophilia: clinical update. *Br J Gen Pract.* 2014;64(619):e120-2.
4. Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, et al. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem.* 2004;50(7):1156-64.