



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines

Trabajo de Investigación para optar por el Título de Licenciatura en Microbiología y
Química Clínica.

**DETERMINAR LA PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES -8 G>C, -13 C>T,
11396 G >A Y DEL POLIMORFISMO 46 C >T
EN 100 MUESTRAS DEL BANCO DE ADN DEL CIHATA.**

TUTORA:

Dra. Lizbeth Salazar Sánchez, Ph.D.

ESTUDIANTE:

WENDY ROJAS UREÑA A-54950

2011

DEDICATORIA

*Al hombre y la mujer que han estado a mi lado desde mi nacimiento,
quienes me han apoyado en las buenas y en las malas y a quienes les debo
lo que hoy soy... MIS PAPAS.*

AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios por el don de la vida y darme la oportunidad de culminar una de mis metas, a mi familia por el apoyo incondicional, a mis abuelitos por sus oraciones a mi tutora y lectores, al personal del CIHATA por su colaboración a lo largo del proyecto y a todos aquellos que de una u otra manera estuvieron a mi lado apoyándome a lo largo de todo mi carrera universitaria.

De corazón Muchas Gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE DE FIGURAS	V
INDICE DE CUADROS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	IX
JUSTIFICACIÓN	1
ANTECEDENTES	2
MARCO TEÓRICO	3
HEMOSTASIA	3
FACTOR HAGEMAN O FACTOR XII	7
ALTERACIONES DEL FACTOR XII	9
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y USO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	11
OBJETIVOS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
METODOLOGÍA	14
RESULTADOS	19
DISCUSION	37
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Cascada de la coagulación (Saénz, 2008)</i>	6
<i>Figura 2. Localización del gen del Factor XII en el cromosoma 5 humano.....</i>	8
<i>Figura 3. Amplificaciones reacción en cadena de la polimerasa 1,2,3,4,5.</i>	20
<i>Figura 4. Amplificaciones reacción en cadena de la polimerasa 6,7,8,9.....</i>	20
<i>Figura 5. Gel de agarosa al 3% para productos de digestión</i>	21
<i>Figura 6. Gel al 4% almacenado en refrigeración, cámara húmeda y protegido de la</i>	22
<i>Figura 7. Gel al 4% usado post polimerización.....</i>	22
<i>Figura 8. Amplificaciones de muestras control para reacción en cadena de la</i> <i>polimerasa del exón 14 del Factor XII</i>	23
<i>Figura 9. Digestión de muestras control para detección de la mutación 11396 G >A en</i> <i>el exón 14 del Factor XII</i>	24
<i>Figura 10. Amplificaciones de muestras control para reacción en cadena de la</i> <i>polimerasa del exón 1 del Factor XII</i>	25
<i>Figura 11. Digestión de muestras control para detección del polimorfismo 46 C >T y la</i> <i>mutación -8 G> C en el exón 1 del Factor XII.....</i>	26
<i>Figura 12. Digestión de muestras control para detección de la mutación -8 G> C y -13</i> <i>C>T en el exón 1 del Factor XII.....</i>	27

<i>Figura 13. Digestión con enzima de restricción del producto amplificado en la reacción en cadena de la polimerasa del exón 14 del Factor XII</i>	28
<i>Figura 14. Análisis del producto digerido con la enzima MvaI (Bst NI) para detección de la mutación 11396 G >A en el exón 14 del Factor XII.....</i>	29
<i>Figura 15. Digestión con enzimas de restricción del producto amplificado en la reacción en cadena de la polimerasa del exón 1 del Factor XII.....</i>	30
<i>Figura 16. Análisis del producto digerido con la enzima HinI I (Bsa HI) para detección del polimorfismo 46 C> T en el exón 1 del Factor XII.....</i>	31
<i>Figura 17. Análisis del producto digerido con la enzima BSU RI (Hae III) para detección del mutación -8 G> C en el exón 1 del Factor XII.....</i>	32
<i>Figura 18. Análisis del producto digerido con la enzima Bgl II para detección del mutación -13 C>T en el exón 1 del Factor XII.....</i>	33
<i>Figura 19. Prevalencia de la mutación 11396 G >A en el exón 14 del gen del FXII... </i>	34
<i>Figura 20. Prevalencia de la mutación -8 G>C en el exón 1 del gen del FXII</i>	35
<i>Figura 21. Prevalencia de la mutación -13 C>T en el exón 1 del gen del FXII.....</i>	35
<i>Figura 22. Prevalencia del polimorfismo 46 C >T en el exón 1 del gen del FXII.....</i>	36

INDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1. Factores de la coagulación según (Saéñz, 2008).....</i>	<i>4</i>
<i>Cuadro 2. Enzimas de restricción para análisis del exón 1 y 14 del gen FXII.....</i>	<i>12</i>
<i>Cuadro 3. Secuencias de iniciadores para amplificación de exón 1 y 14.....</i>	<i>15</i>
<i>Cuadro 4. Reactivos, concentraciones y volúmenes para la estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa del Exón 1 del FXII.</i>	<i>15</i>
<i>Cuadro 5. Reactivos, Concentraciones y volúmenes para la Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa del Exón 14 del FXII.</i>	<i>16</i>
<i>Cuadro 6. Reacción en cadena de la polimerasa variando cantidades de iniciadores y MgCl₂</i>	<i>18</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: *Ácido desoxirribonucleico*

ARN: *Ácido ribonucleico*

CIHATA: *Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines*

DMSO: *Dimetilsulfoxido.*

dNTPs: *Desoxidonucleósidos trifosfato*

EDTA: *Etilen-diamino-tetra-acetato*

FT: *Factor tisular.*

FXII: *Factor Hageman o Factor XII*

HMWK: *Cininógeno de alto peso molecular*

MTHFR: *Metiltetrahidrofolatoreductasa*

PK: *Precalicleína*

SDS: *Dodecilsulfato sódico*

SNP: *Polimorfismo de sustitución de nucleótido*

TM: *Trombomodulina*

T-FPI: *Inhibidor de la vía del factor tisular*

T-PA: *Activador tisular del plasminógeno*

TTP: *Tiempo parcial de tromboplastina*

RESUMEN

La enfermedad trombótica es un enfermedad multifactorial y compleja de gran prevalencia a nivel mundial y nacional, los factores que predisponen a ella son tanto ambientales como genéticos (Soria, 2009). Dentro de los factores trombogénicos presentes en la población costarricense se pueden mencionar: deficiencias de Antitrombina III, Proteína C y Proteína S, la determinación del Factor V Leyden, el polimorfismo G20210 de la variante de la protrombina y la mutación C677T de la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (Chaves et al.,2002). Sin embargo estudios en otras poblaciones han descrito las mutaciones -8 G>C, -13 C>T, 11396 G >A y el polimorfismo 46 C >T en el exón 1 y 14 del gen del FXII que disminuyen los niveles plasmáticos de esta proteína lo que se asocian a riesgo trombótico.

El gen del FXII se localiza en el cromosoma 5 y codifica por una proteína sintetizada en el hígado como una serin proteasa que participa en la vía intrínseca de la cascada de la coagulación así como en el sistema fibrinolítico, donde luego de la activación del FXII la unidad α -FXIIa escinde la precalicreína para formar calicreína, la cual induce la liberación de activador tisular del plasminógeno (t-PA), luego éste escinde la prourocinasa para formar urocinasa, la cual finalmente activa el plasminógeno (beta-globulina que circula como un proenzima) en plasmina, para así lisar el coágulo o trombo que se formó al activarse la cascada de la coagulación (Schloesser *et al.*,1997). Es por esta razón que pacientes con bajos niveles plasmáticos de FXII tienen su actividad fibrinolítica disminuida de ahí el porqué de la asociación entre deficiencia del FXII y riesgo trombótico.

El trabajo de investigación tiene como objetivo general determinar la prevalencia de las mutaciones -8 G>C, -13 C>T, 11396 G >A y del polimorfismo 46 C >T en 100 muestras del banco de ADN del CIHATA. Para lograr dicho objetivo se estandarizó una reacción en cadena de la polimerasa para amplificar los exones en estudio y su posterior análisis mediante enzimas de restricción.

Se obtuvieron los siguientes resultados para las 100 muestras participantes, una prevalencia del 0% para las mutaciones -8 G>C, -13 C>T, 11396 G >A por lo que el 100% de las muestras presentan genotipo tipo silvestre, mientras que para el polimorfismo 46 C >T la prevalencia fue de un 14% para el genotipo homocigoto, 34% genotipo heterocigoto y 52% con genotipo tipo silvestre.

Con estos resultados se demuestra que el polimorfismo 46 C >T en el exón 1 del gen del FXII está presente en la población costarricense, por tanto se abre la posibilidad para que el CIHATA como centro de investigación le ofrezca a sus pacientes una prueba más para el estudio de la enfermedad trombótica, así como estudios futuros de casos y controles para correlacionar presencia de la mutación con enfermedad trombótica.

JUSTIFICACIÓN

La trombosis es una enfermedad compleja dada por la interacción de los factores ambientales así como los factores genéticos; constituye una de las principales causas de mortalidad y morbilidad y tiene gran importancia en la patogenia del infarto agudo del miocardio, accidentes cerebrovasculares y trombo embolismos de tipo venoso (Soria, 2009).

El gen del Factor XII, ubicado en el cromosoma 5 y compuesto por 14 exones, codifica para la proteína plasmática del FXII, que participa en el inicio de la vía intrínseca de la cascada de la coagulación sanguínea, así como en el sistema fibrinolítico y la generación de bradiquinina y angiotensina (Mordillo *et al.*, 2007).

Para este gen se ha detectado las mutaciones -8 G>C y -13 C>T en el exón 1, así como la mutación 11396 G >A en el exón 14. Además se ha descrito el polimorfismo 46 C>T localizado en el exón 1, en la región reguladora de la traducción del ARNm, disminuyendo los niveles plasmáticos del FXII y alterando la función fibrinolítica del factor de la cascada de la coagulación, lo que se asocia a trastornos trombóticos (Schloesser *et al.*, 1997).

En la actualidad no existen datos exactos de cual es la prevalencia de este polimorfismo y mutaciones en nuestro país, por lo que implementando una técnica de biología molecular se abre la puerta para la realización de numeroso estudios, que nos permitan establecer si los pacientes presentan variaciones en el gen que codifica para el Factor XII y relacionarlo con la historia clínica del paciente. Además de lo anterior, se permitirá obtener datos epidemiológicos que nos permitan conocer el comportamiento de la población costarricense, con respecto a este polimorfismo.

Por otra parte este procedimiento permite ofrecer a los pacientes del Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA) un estudio más completo para estudiar su grado de susceptibilidad a procesos trombóticos.

ANTECEDENTES

La enfermedad trombótica es un enfermedad multifactorial y compleja de gran prevalencia a nivel mundial y nacional, los factores que predisponen a ella son tanto ambientales como genéticos (Soria, 2009).

En los últimos años el estudio de la enfermedad trombótica ha incrementado y se ha logrado identificar con claridad factores trombogénicos como: deficiencias de Antitrombina III, Proteína C y Proteína S, la determinación del Factor V Leyden, el polimorfismo G20210 de la variante de la protrombina y la mutación C677T de la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (Chaves et al.,2002). Sin embargo, existen otras deficiencias que no se pueden dejar de lado, ya que existe conocimiento y pruebas que confirman la presencia de polimorfismos y mutaciones en genes que codifican para otros factores de la coagulación como lo es el Factor XII (FXII). Estos cambios en el material genético del gen del FXII se asocian con riesgo trombótico y se ha observado que portadores homocigotos y heterocigotos tienen mayor riesgo que lo no portadores (Soria, 2009).

En Costa Rica, la trombosis venosa profunda es una causa frecuente de morbilidad y mortalidad; al estar la población expuesta a gran variedad de factores desencadenantes de trombosis como: alta incidencia de varices, uso de anticonceptivos orales, trauma, tabaquismo, hipercolesterolemia y sin dejar de lado el factor genético, donde se han descrito polimorfismos que aumentan el riesgo al padecimiento de eventos trombóticos (Pussi, 2001).

Con el pasar de los años y en aras de mejorar el diagnóstico de enfermedades clásicas y emergentes, constantemente se trabaja en la implementación de nuevas técnicas que, junto a técnicas clásicas, aligeran y mejoran el diagnóstico de la enfermedad. Un ejemplo son las técnicas en biología molecular, entre ellas la reacción en cadena de la polimerasa, que se podría aplicar para contribuir a esclarecer los factores genéticos que aún se encuentran en proceso de definir su prevalencia en una población definida (Sáenz, 2008).

MARCO TEÓRICO

Hemostasia

El cuerpo humano debe mantenerse en equilibrio constante para su correcto funcionamiento. La hemostasia es un conjunto de mecanismos procoagulantes, anticoagulantes, de agregación plaquetaria y anti agregación plaquetaria, los cuales permiten mantener la sangre líquida dentro de los vasos sanguíneos e impide la pérdida de la misma ante algún daño vascular (Sáenz, 2008)

Los componentes que intervienen en la hemostasia son los vasos sanguíneos, las plaquetas, los factores de la coagulación (Cuadro 1) el sistema de fibrinólisis y sus inhibidores. La hemostasia se ha dividido en hemostasia primaria y secundaria. La hemostasia primaria está conformada por los vasos sanguíneos y plaquetas, los cuales responden ante el daño vascular, mientras que en la hemostasia secundaria participan los factores de la coagulación, el sistema fibrinolítico y sus inhibidores, cuyo objetivo final es la producción de un coágulo y remoción del mismo cuando sea necesario. (Páramo *et al.*, 2009)

Hemostasia primaria

Ante un daño vascular, la primera reacción es mediada por la interacción entre las plaquetas y la pared vascular. Los vasos sanguíneos están formados por células endoteliales, las cuales funcionan como aislante entre la sangre y el colágeno subendotelial con el factor tisular (FT) (Ruiz, 2009). Por otra parte secretan sustancias que controlan el tono vascular, por ejemplo: prostaciclina y óxido nítrico que promueven la relajación del músculo liso en el estado inactivo del endotelio mientras que en caso de daño endotelial, se produce tromboxano A₂ y endotelinas, de manera que se da la vasoconstricción; evento de gran importancia al reducirse el flujo sanguíneo a la lesión, impidiendo la salida de sangre temporalmente. Otro factor involucrado son las plaquetas, estas se adhieren al vaso lesionado y se agrupan formando el conocido tapón plaquetario que contribuye al control de la hemorragia (Bayona *et al.*, 2010).

Hemostasia secundaria

Al igual que en la hemostasia primaria la causa de su activación es el daño vascular, el cual expone al FT y permite la activación de la cascada de la coagulación o fase fluida de la hemostasia; cuyo fin es la formación de una malla de fibrina que junto con la vasoconstricción y el tapón plaquetario, tapan la zona vascular lesionada e impiden la extravasación de la sangre. Esta cascada es una cadena de reacciones bioquímicas donde la activación de un factor de coagulación activa al siguiente (ver Figura 1), para así activar a la trombina y que ésta a su vez convierta el fibrinógeno (soluble en plasma) en fibrina (insoluble), la cual es el componente estructural del coágulo. (Páramo *et al.*, 2009)

Cuadro 1. Factores de la coagulación según (Saézn, 2008).

FACTORES	NOMBRE	FORMA ACTIVA
I	Fibrinógeno	Subunidad de fibrina
II	Protrombina	Proteasa de serina
III	Factor tisular	Receptor/ cofactor
V	Factor lábil	Cofactor
VII	Pro convertina	Proteasa de serina
VIII	Factor anti hemofílico	Cofactor
IX	Factor Christmas	Proteasa de serina
X	Factor Stuart-Prower	Proteasa de serina
XI	Antecedente tromoplastínico Del plasma	Proteasa de serina
XII	Factor Hageman (factor de contacto)	Proteasa de serina
	Factor estabilizante de la fibrina	Transglutaminasa
	Precalicroína (factor Fletcher)	Proteasa de serina
XIII	Factor Fitzgerald (HMWK)	Cofactor

Según Páramo y sus colaboradores (2009) se propone un modelo clásico para la cascada de la coagulación, la cual se divide en dos vías: una intrínseca iniciada por el Factor XII, el cininógeno de alto peso molecular (HMWK), la precalicreína (PK) y el Factor XI y otra extrínseca dada por la interacción entre el FT y el Factor VII; ambas convergen en una vía común con el Factor Xa.

Vía extrínseca

Ésta se inicia cuando, ante un daño vascular, el FT del subendotelio o células no vasculares entran en contacto con la sangre y forma un complejo con el FVII, lo que hace que éste se active y a su vez, en presencia de calcio, activa el Factor X, el cual genera trombina a partir de Factor II (Saénz, 2008).

Vía intrínseca

Es una vía más lenta, ante el daño en la luz vascular se expone la matriz de colágeno cargada negativamente, al entrar en contacto ésta y la sangre se comienza una serie de reacciones entre cuatro proteínas plasmáticas: Factor XII, el HMWK, la PK y el Factor XI. Cuando el Factor XII entra en contacto con esta superficie se autoactiva a Factor XIIa, éste a su vez escinde y activa el Factor XI a XIa y de PK a calicreína (K), en este punto inicia la vía intrínseca para la generación de trombina (Kitchens, 2002).

Como se mencionó (ver Figura 1) el Factor XIIa activa el Factor XI a Factor XIa, el cual genera Factor IXa, este nuevo factor activado convierten el Factor X en Factor Xa pero para ello requiere de calcio, fosfolípidos (factor plaquetario 3) y Factor VIIIa que es un cofactor glicoproteico (Ruiz, 2009).

Vía común

Es el punto donde la vía extrínseca e intrínseca interaccionan entre sí. Está dada por los Factores X, V, II y I. El Factor Xa, en presencia del Factor Va, calcio y fosfolípidos, activa el Factor II (protrombina) convirtiéndolo en trombina, la cual transforma el fibrinógeno (factor I) en fibrina. Finalmente, el factor XIII activado, junto con calcio estabiliza la malla de fibrina y la hace resistente a la fibrinólisis (Undas, 2008).

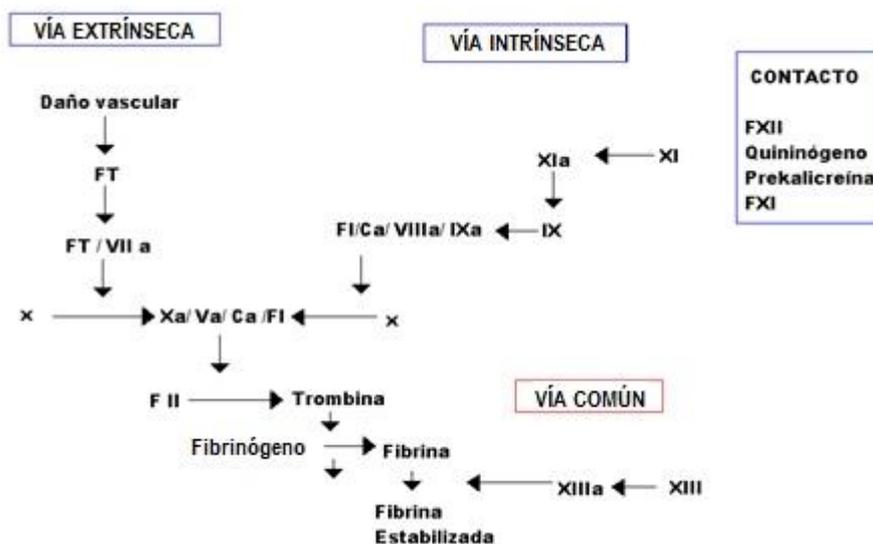


Figura 1. Cascada de la coagulación (Saénz, 2008)

Según Ruiz (2009) existen una serie de pruebas de escrutinio hemostático que, junto con la historia clínica y la exploración del paciente permiten valorar las vías que conforman la cascada de la coagulación y de esta manera orientar un diagnóstico. Entre ellas se pueden citar: número de plaquetas, tiempo de hemorragia, tiempo de protrombina (TP) para la vía extrínseca hasta la formación de fibrina o el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTP) para la vía intrínseca.

Control de la Coagulación

El control de la coagulación es dado para evitar la continua formación de trombina que impida el flujo normal de la sangre, aquí tiene su papel el sistema fibrinolítico; este sistema al igual que la cascada de la coagulación consiste en una cascada de zimógenos que van siendo activados (Ruiz, 2009).

La plasmina es la enzima principal del sistema fibrinolítico cuya función es degradar la fibrina producto final de la cascada de la coagulación en residuos específicos de lisina y arginina y se origina cuando el activador de plasminógeno tisular (t-PA) liberado por las células endoteliales en respuesta a la trombina realiza un corte proteolítico del plasminógeno (Bayona *et al.*, 2010).

Paralelo a esto el sistema fibrinolítico es regulado por inhibidores, estos son: el inhibidor del factor activador del plasminógeno y los inhibidores de la plasmina: α_2 antiplasmina y la α_2 macroglobulina. Además hay una expresión de antitrombina III

(ATIII) e inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) que inhiben al factor Xa no unido a las células que liberan factor tisular o a las plaquetas activadas impidiendo la formación de trombina. También la trombina es regulada al unirse a la trombomodulina (TM) y de esta manera activa la proteína C que escinde al FVa y el FVIIIa para controlar la producción de nuevas moléculas de trombina; como cofactor de la proteína C participa la proteína S que aumenta la afinidad de la proteína C y a la vez este complejo inactiva al inhibidor del factor activador del plasminógeno (Bayona *et al.*, 2010).

Factor Hageman o Factor XII

El factor XII es una β -glucoproteína monocatenaria de 596 residuos de aminoácidos, con una masa de 80 kDa, sintetizada en el hígado por los hepatocitos como una serin-proteasa. Se encuentra en plasma como un zimógeno cuya concentración normal es de aproximadamente 30 $\mu\text{g/ml}$, la cual puede variar entre 15 – 47 $\mu\text{g/ml}$ según individuos y razas. Este factor está compuesto por un dominio carbono terminal catalítico, dos dominios tipo fibronectina, un dominio del factor de crecimiento epidérmico, y un dominio tipo anillo, que es un componente encontrado en la mayoría de las proteínas implicadas en el sistema de la fibrinólisis (Kanaji *et al.*, 1998).

Cuando esta proteína plasmática FXII entra en contacto con superficies que estén cargadas negativamente como es el caso de una superficie lesionada, se da una proteólisis enzimática, lo que transforma esta proteína en una proteína bicatenaria con actividad serin- proteasa que sería el FXIIa (Ros *et al.*, 2005). La activación de este factor se da 100 veces más rápido junto con el HMWK y la calicreína con los cuales conforman el sistema de contacto, cuyo producto final de activación es la producción de bradicinina, un mediador celular (Bryant, 2009).

El FXII puede ser activado por proteólisis, auto activación o por la calicreína, que la escinde en α -FXIIa y β -FXIIa, y se acelera al interactuar con una superficie con carga negativa; una vez que es activado, el FXII induce la activación del Factor XI para que se de inicio a la vía intrínseca de la coagulación (Schloesser *et al.*, 1997).

Otra de las funciones del Factor Hageman, no menos importante, es su participación en la vía fibrinolítica, donde el α -FXIIa escinde la precalicreína para formar calicreína, la cual induce la liberación de activador tisular del plasminógeno (t-PA), luego éste escinde la prourocinasa para formar urocinasa, la cual finalmente activa el plasminógeno (beta-globulina que circula como un proenzima) en plasmina, para así

lisar el coágulo o trombo que se formó al activarse la cascada de la coagulación (Schloesser *et al.*,1997).

Pero no sólo se le atribuyen al Factor Hageman las funciones mencionadas sino que se ha visto participación de este factor en la estimulación de la inflamación al inducir la liberación de bradicinina, un mediador celular que aumenta la permeabilidad vascular permitiendo que se filtren líquidos en los tejidos y que participe en la regulación de la liberación de IL-1 e IL-6 a partir de monocitos, y en la agregación y degranulación de los neutrófilos. Además se le atribuye un efecto antitrombótico y actúa como inhibidor de la agregación plaquetaria inducida por trombina, al unirse al complejo glicoproteico plaquetario Ib-IX-V (Johnson *et al*, 2010).

Conformación genética

El gen que codifica para el Factor Hageman (Oguchi *et al.*, 2005) esta organizado en 13 intrones y 14 exones para un aproximado de 12 kb; se localiza en el brazo largo del cromosoma 5 entre la posición 33 y el final del brazo, específicamente entre las pares de bases 176 829 138 a 176 836 576.

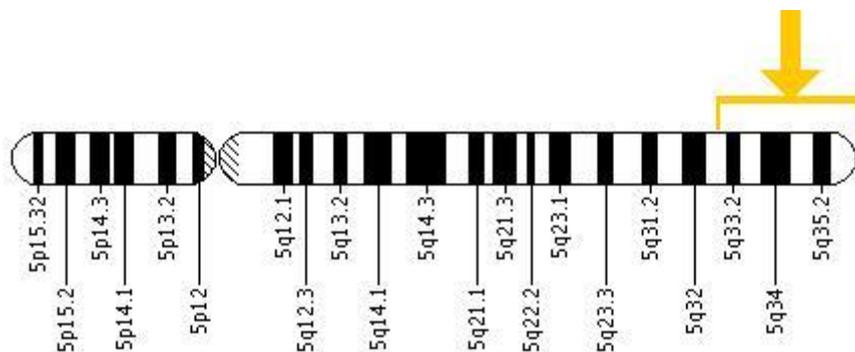


Figura 2. Localización del gen del Factor XII en el cromosoma 5 humano (<http://ghr.nlm.nih.gov>)

Alteraciones del Factor XII

La genómica permite identificar variaciones en las secuencias de ADN que pueden ser generadas por errores en la replicación y reparación del ADN. Si esos cambios se mantienen evolutivamente y alcanzan una prevalencia de un 1 % pasan de ser mutación a considerarse un polimorfismo. Más del 90% de los polimorfismos identificados son sustituciones de un nucleótido (por sus siglas en inglés SNP), se pueden localizar en regiones poco trascendentes del gen o bien en regiones reguladoras o codificantes afectando la transcripción, estabilidad del ARN, traducción, procesos postraduccionales, estructura, estabilidad o función de la proteína (García, 2004).

Polimorfismo 46 C>T, -4 C>T o rs 1801020

Varios autores han descrito un polimorfismo en el exón 1 del gen del factor XII, este polimorfismo de alta frecuencia en población caucásica (7% homocigotos y 29% heterocigotos) corresponde a un polimorfismo de sustitución de nucleótido (SNP) en la posición 46, donde se da el cambio de citosina (C) por timina (T). Este nucleótido se encuentra incluido en la secuencia Kozak, región reguladora de la traducción de ARNm que le facilita al ribosoma el reconocimiento del codón de inicio (AUG) para iniciar la traducción proteica, es por esta razón que ante la sustitución de nucleótido en esta posición se altera la eficacia de la traducción al producirse un péptido de sólo 2 residuos de aminoácidos (Met-Pro) (Ros *et al.*, 2005).

Mediante un análisis integral del genoma se demostró implicación del gen del FXII en la determinación de la variabilidad plasmática de factor XII (Soria *et al.*, 2009). Por lo tanto, el genotipo para el FXII tendrá asociación significativa con los niveles plasmáticos de Factor XII y Factor XIIa. Se ha demostrado que los homocigotos (ho) T/T tienen hasta un 40% menos en relación con los tipo silvestre (wt) C/C mientras que los heterocigotos (hz) tienen valores intermedios (Bach *et al.*, 2007).

Los individuos con deficiencia del Factor XII presentan prolongación del tiempo trombolastina parcial (TTP). Una persona sin deficiencia del Factor XII presenta un TTP de 32 s, mientras que aquellos deficientes tienen los siguientes tiempos: heterocigotos 34 s y homocigotos 37 s, sin clínica hemorrágica asociada. No obstante, ciertos estudios muestran asociación con trombosis venosa y afirman que aquellos portadores homocigotos y heterocigotos tienen mayor riesgo de eventos trombóticos que los no portadores (Soria, 2009).

Datos recientes atribuyen menor importancia al papel del Factor XII en la coagulación y refuerzan el desempeño de esta proteína en la fibrinólisis e inflamación; por lo que aquellos sujetos con valores bajos de Factor XIIa, como los portadores del alelo C46T, tendrán disminuida su actividad fibrinolítica y actividad antitrombótica, condiciones que son factor de riesgo para infarto agudo de miocardio y procesos trombóticos (Ros *et al.*, 2005).

Otros estudios revelan la implicación de este polimorfismo como factor de riesgo de eventos trombóticos durante el primer embarazo, además de un efecto sinérgico de la hipercolesterolemia con el polimorfismo descrito (Soria, 2009).

Otras mutaciones descritas para el gen del FXII

Diferentes grupos de investigadores han llevado a cabo estudios de caso control con poblaciones alemanas, suizas y japonesas con el fin de detectar mutaciones en otros exones del FXII además del polimorfismo antes descrito.

Schloesse y colaboradores (1997) descubrieron varias mutaciones donde las más frecuentes fueron en el exón 14 y el exón 1, en un grupo donde participan pacientes alemanes, suizos y australianos. La mutación en el exón 14 se localiza en la posición 11396, donde una guanina (G) es sustituida por adenina (A) cambiando así la secuencia de aminoácidos codificada por este exón. Por otra parte, existen dos mutaciones más en el exón 1 aparte del polimorfismo ya descrita, estas se localizan corriente arriba de la región promotora en la posición -8 y -13. La mutación en la posición -8 una guanina (G) es sustituida por una citosina (C), lo que se asocia con un sitio de restricción aberrante para el alelo Taq I-A en el intron B (Schloesser *et al.*, 1997) y la mutación en la posición -13, donde una citosina (C) es sustituida por una timina (T), alterando el sitio de unión del factor transcripcional HNF4- α , factor encargado de regular la expresión del gen FXII (Mordillo *et al.*, 2007).

Reacción en Cadena de la Polimerasa y uso de enzimas de restricción

Reacción en cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica en biología molecular creada por Kary Mullis en el año 1983 que permite amplificar "in vitro" segmentos de ADN puro o en mezcla desde 50 pares de bases hasta 2000 pares de bases (Satz, 1993).

El fundamento de esta técnica se basa en la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) empleando una ADN polimerasa. Esta enzima sintetiza a partir de una cadena sencilla de ADN una cadena complementaria en sentido 5' - 3' con ayuda de iniciadores (primers), los cuales son oligonucleótidos diseñados para que sean complementarios a cada uno de los extremos del fragmento de ADN que se desea amplificar (Satz, 1993).

Este método de amplificación consiste en tres reacciones continuas: desnaturalización, apareamiento y extensión que se llevan a cabo a diferentes temperaturas, las cuales se repiten cíclicamente entre 20 y 40 veces dependiendo del protocolo que se esté siguiendo, permitiendo al final obtener miles de copias del segmento delimitado por los iniciadores (Rodríguez y Barrera, 2004).

La desnaturalización es la primera etapa de la reacción en cadena de la polimerasa esta consiste en aumentar la temperatura de la reacción entre 94°C- 96°C entre 30s y 1 min para romper los puentes de hidrógeno del ADN y así lograr la desnaturalización del mismo (Rodríguez y Barrera, 2004).

El apareamiento o annealing es la etapa que prosigue a la desnaturalización, en este paso luego de que el ADN es desnaturalizado la temperatura de reacción se reduce con el fin de que las hebras molde separadas se apareen por complementariedad con los iniciadores, los cuales son oligonucleótidos que definen el segmento de ADN que se desea replicar (Rodríguez y Barrera, 2004).

Finalmente la extensión o elongación de la cadena es el paso en el que la ADN polimerasa sintetiza la nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde, esta

síntesis se da añadiendo los desoxidonucleósidos trifosfato (dNTPs) en dirección 5`-3` uniendo el grupo 5`-fosfato de los dNTPs con el grupo 3`-hidroxilo del final de la hebra de ADN y a una temperatura óptima para que se de la reacción (Rodríguez y Barrera, 2004).

Enzimas de Restricción

Las enzimas de restricción son endonucleasas aisladas de bacterias que reconocen una secuencia de ADN específica entre 4 y 8 bp. El sitio de reconocimiento para cada enzima se conoce con el nombre de sitio de restricción, y es aquí donde la enzima rompe un enlace fosfodiéster en la hebra de 5' - 3', así como en la sentido 3' -5'. (Hartl y Jone, 2005).

Tras la digestión del ADN amplificado, que se da a una temperatura y por un tiempo específico, los fragmentos de ADN resultantes se separan según su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa. En la electroforesis, las moléculas de ADN, que poseen carga negativa dada por los fosfatos de la molécula, migran hacia el electrodo positivo; esta migración se da según el tamaño del poro del gel de agarosa, el cual depende de la concentración del gel. Como resultado de esta migración a través del gel de agarosa se produce una separación continua de los fragmentos, encontrando aquellos más pequeños lejos del punto de aplicación de la muestra (Hartl y Jone, 2005).

La concentración del gel de agarosa depende del tamaño del fragmento de ADN que se quiere observar, conforme disminuye el tamaño del fragmento aumenta la concentración del gel, por tanto si se trata del ADN completo, sin someterse a algún proceso de amplificación se usan concentraciones de 0.8%, para segmentos de 500 bp a 1500bp de 1% a 2% y los segmentos más pequeños entre 100pb a 500pb en geles al 4% o 6% (Posso, 2009).

En el siguiente cuadro se exponen las enzimas de restricción empleadas para analizar los exones 1 y 14 del gen Factor XII, así como sus puntos de corte, posición y secuencia en el gen, además del tamaño de los fragmentos generados por las enzimas, tomando como referencia la secuencia del gen dada por Cool y colaboradores (Cool y Ros, 1987)

Cuadro 2. Enzimas de restricción para análisis del exón 1 y 14 del gen FXII

Enzima de Restricción	Sitio de Reconocimiento 5'----3'	Posición en gen Sitio reconocimiento	Secuencia en el gen	Fragmentos generados
Hin1 I (Bsa HI)	G(A/G) /CG(T/C)C C(C/T)GC/ (G/A)G	+ 46 Exon 1	GACGCC	Wt: 293 bp y 84 bp Hz: 377 bp, 293 bp, 84 bp Ho: 377 bp
BSU RI (Hae III)	GG /CC CC/ GG	-8 Exon 1	GGCC	Wt: 242 bp y 135 bp Hz: 377 bp, 242 bp, 135 bp Ho: 377 bp
Bgl II Reconoce Secuencia mutada	A/GATCT TCTAG/A	-13 Exon 1	AGACCT	Wt: 377 bp Hz: 377 bp, 233 bp, 144 bp Ho: 233 bp y 144 bp
MvaI (Bst NI)	CC /(A/T)GG GG(T/A)/ CC	+11396 Exon 14	CCAGG	Wt: 147 bp y 96 bp Hz: 243bp,147 bp, 96bp Ho: 243 bp

wt: tipo silvestre, Hz: heterocigoto, Ho: homocigoto

OBJETIVOS

Objetivo general

- Establecer la prevalencia de las mutaciones -8 G>C, -13 C>T, 11396 G >A y del polimorfismo 46 C >T en 100 muestras del banco de ADN del CIHATA.

Objetivos específicos

1. Estandarizar e implementar la reacción en cadena de la polimerasa para el análisis de las mutaciones -8 G>C, -13 C>T ,11396 G >A y del polimorfismo 46 C >T en el gen del Factor XII.
2. Determinar la presencia del polimorfismo 46 C>T así como las mutaciones -8 G>C y -13 C>T en el exón 1 en un aproximado de 100 muestras pertenecientes al banco de ADN del CIHATA.
3. Determinar la presencia de la mutación 11396 G>A en el exón 14 en un aproximado de 100 muestras pertenecientes al banco de ADN del CIHATA.

METODOLOGÍA

Muestras: se procesaron 100 muestras de ADN pertenecientes al banco de ADN del CIHATA, cada una de ellas con su respectivo consentimiento informado según el proyecto 807-A6-322 inscrito y financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. El ADN fue extraído empleando un método de extracción con NaCl según Miller et al. usando sangre obtenida con EDTA como anticoagulante (Ross et al., 1991).

ADN controles: se contó con controles de ADN brindados por la Universidad de Greifswald Alemania, institución que ha colaborado con estudios realizados en el CIHATA. Estos controles se corrieron junto a un marcador de peso molecular lo que permitió su análisis con el programa UVI- soft para corroborar el peso molecular de las bandas generadas.

Cuantificación de ADN: para cada una de las muestras participantes en la estandarización se cuantificó su concentración mediante espectrofotometría, de esta manera se determinó el rango de concentraciones de ADN a utilizar en la reacción en cadena de la polimerasa

Iniciadores: para amplificar una región del exón 1 y 14 del gen del factor XII que contiene el polimorfismo y las mutaciones descritas previamente por (Schloesse *et al.*, 1997) y (Mordillo *et al.*, 2007) se utilizaron iniciadores cuyas secuencias fueron facilitadas por la Universidad de Greifswald Alemania (ver cuadro 3).

Cuadro 3. Secuencias de iniciadores para amplificación de exón 1 y 14

EXON 1	<p><i>5'-TAA CCT CCT GAT CTC CAC AGG AC--3'</i></p> <p><i>5'- ATC CTG GTT CCC ACA GCA CTC--3'</i></p>
EXON 14	<p><i>5'-CTC AGG TCC ACA GCG CTG AGC--3'</i></p> <p><i>5'- CCA GCC ACT CTC TCA CTG CG--3'</i></p>

Ensayo de PCR: se estandarizó e implemento la reacción en cadena de la polimerasa para el exon1 y 14 del gen del FXII (ver cuadro 4 y 5)

Cuadro 4. Reactivos, concentraciones y volúmenes para la estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa del Exón 1 del FXII.

REACTIVO	CONCENTRACION EN REACCIÓN
Taq Buffer+(NH₄)₂SO₄ - MgCl₂	1X
MgCl₂	1.5 mM
dNTPs	0.025 mM
Primer Reverse	0.5 mM
Primer Forward	0.5 mM
Taq Polimerasa	0.025 U/μL
DMSO	--
ADN	10 - 100 ng/μL
Agua bidestilada estéril	--

Para la estandarización de la técnica la reacción se colocó en un termociclador bajo el siguiente programa: desnaturalización a 94°C por 3 minutos con 40 segundos, apareamiento a 60°C por 40 segundos y extensión a 72°C por 6 minutos con 30 segundos, para un total de 30 ciclos.

Cuadro 5. Reactivos, Concentraciones y volúmenes para la Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa del Exón 14 del FXII.

REACTIVO	CONCENTRACION EN REACCIÓN
Taq Buffer+(NH₄)₂SO₄ - MgCl₂	1X
MgCl₂	2.5 mM
dNTPs	0.0125mM
Primer Reverse	0.5 mM
Primer Forward	0.5 mM
Taq Polimerasa	0.026U/μL
DMSO	--
ADN	10 - 100 ng/μL
Agua bidestilada estéril	--

Para la estandarización de la técnica la reacción se colocó en un termociclador bajo el siguiente programa: desnaturalización a 94 °C por 3 min con 40s, apareamiento a 63 °C por 40 s y extensión a 72 °C por 6 min y 30 s, para un total de 30 ciclos.

Análisis del producto amplificado: una vez amplificado el ADN se tomaron 5 μl de producto amplificado y se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en una concentración de $1,25 \times 10^{-5}$ μg/dl.

Digestión: la reacción se realizó en un volumen final de 15μl conteniendo: 12 μl de producto amplificado y 3 μl de enzima diluida en su respectivo amortiguador.

Enzimas de restricción para el exón 1 y 14: para el análisis del exón 1 se emplearon las enzimas de restricción Hin11(Bsa HI), BSURI (Hae III), BgL II y para el exón 14 la

enzima MvaI (BstNI), estas reconocen distintos sitios de restricción del producto amplificado (ver cuadro 2).

Análisis del producto digerido: 10 μ l de producto digerido se mezcló con 3 μ l de tinte de carga, luego se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio en una concentración $1,25 \times 10^{-5}$ μ g/dl. Además, se usó un marcador de peso molecular Fermentas de 50bp y 100bp para confirmar si las bandas obtenidas eran las esperadas.

RESULTADOS

Implementación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Para determinar la presencia de las mutaciones y el polimorfismo en el gen del Factor XII se siguió el protocolo descrito previamente en la metodología tanto para la reacción en cadena de la polimerasa del exón 14 como del exón 1. Sin embargo se hicieron algunas pruebas y surgieron ciertos eventos que serán descritos a continuación y que contribuyeron a mejorar el procedimiento.

Amplificación del exón 14

Con el fin de obtener una buena señal de amplificación del exón 14 se realizaron nueve reacciones en cadena de la polimerasa siguiendo el protocolo descrito en la metodología variando la cantidad de iniciadores y MgCl₂ (ver cuadro 6) para así elegir la cantidad de iniciadores y MgCl₂ con la que se obtiene mejor señal de amplificación

Cuadro 6. Reacción en cadena de la polimerasa variando cantidades de iniciadores y MgCl₂

Reacción en cadena de la polimerasa	Iniciadores μL	MgCl₂ μL
<i>PCR #1</i>	0.2	2.0
<i>PCR #2</i>	0.2	2.5
<i>PCR #3</i>	0.2	3.0
<i>PCR #4</i>	0.25	2.0
<i>PCR #5</i>	0.25	2.5
<i>PCR #6</i>	0.25	3.0
<i>PCR #7</i>	0.3	2.0
<i>PCR #8</i>	0.3	2.5
<i>PCR #9</i>	0.3	3.0

Se procesaron tres muestras diferentes con cada uno de los protocolos de PCR y se obtuvieron los siguientes productos amplificados (figura 3 y 4).

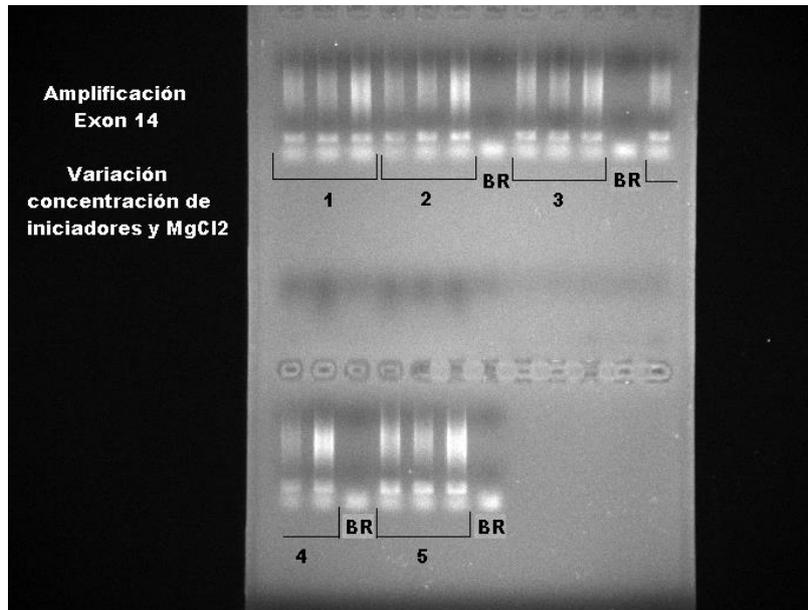


Figura 3. Amplificaciones reacción en cadena de la polimerasa 1,2,3,4,5.

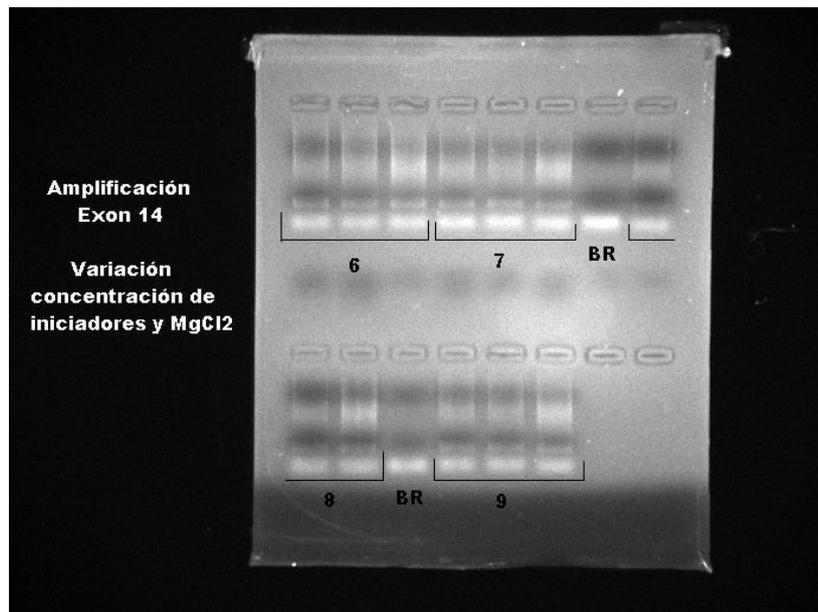


Figura 4. Amplificaciones reacción en cadena de la polimerasa 6,7,8,9

Al comparar las señales de amplificación obtenidas en cada una de las nueve reacciones en cadena de la polimerasa, se observó que las mejores amplificaciones se obtuvieron en la PCR 1,2,3 y 5 no así en la PCR 4,6,7,8,9 cuyas señales son más débiles.

Gel de agarosa con bromuro de etidio

Para visualizar los productos de digestión se elaboró un gel de agarosa al 3%. En este gel al 3% (ver figura 5) las señales obtenidas no tenían la resolución adecuada por tanto se elaboró un gel al 4% donde las señales fueron mejor definidas, por esta razón las digestiones se visualizaron en un gel al 4% lo que facilitó el análisis e interpretación de las muestras procesadas.

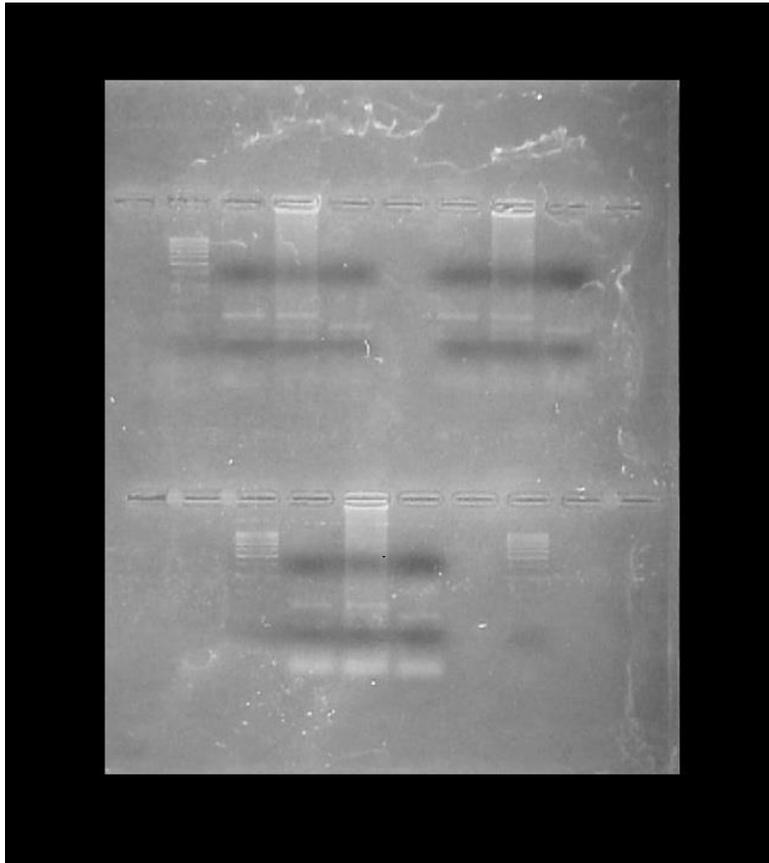


Figura 5. Gel de agarosa al 3% para productos de digestión

Por otra parte se observó que si los geles al 4% para ver el producto de digestión son preparados el día anterior y almacenados bajo las siguientes condiciones: refrigeración, cámara húmeda y protegidos de la luz no es posible observar las señales (ver figura 6) contrario a esto si se elabora el gel al 4 % y posterior a su polimerización es empleado para correr los productos digeridos (ver figura 7) las bandas son interpretables.

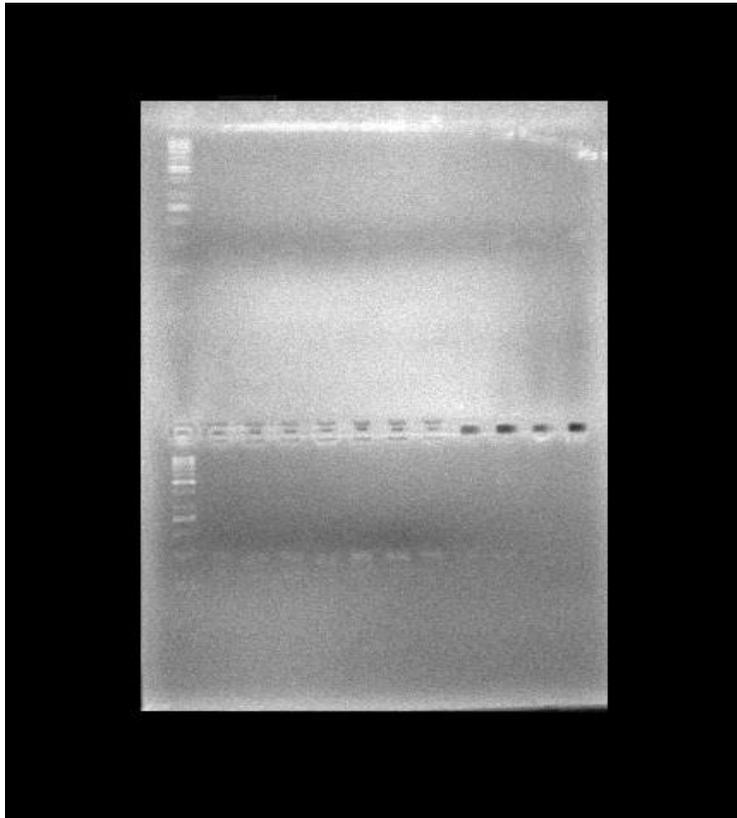


Figura 6. Gel al 4% almacenado en refrigeración, cámara húmeda y protegido de la luz.

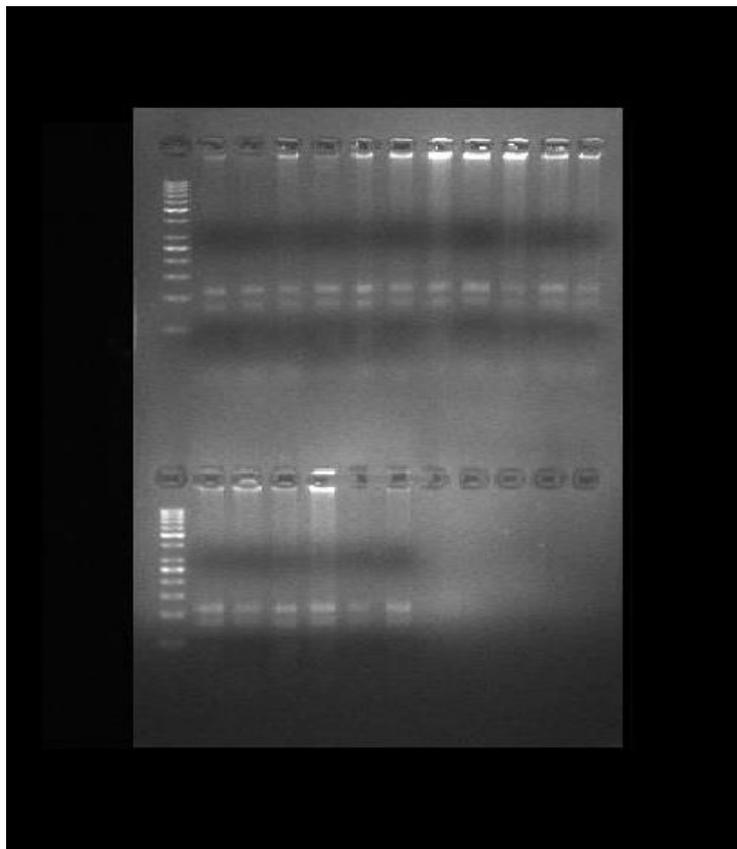


Figura 7. Gel al 4% usado post polimerización.

Amplificación y digestión de las muestras control para detección de las mutaciones y el polimorfismos en los exones 1 y 14 del gen del Factor XII.

Amplificación controles Exón 14

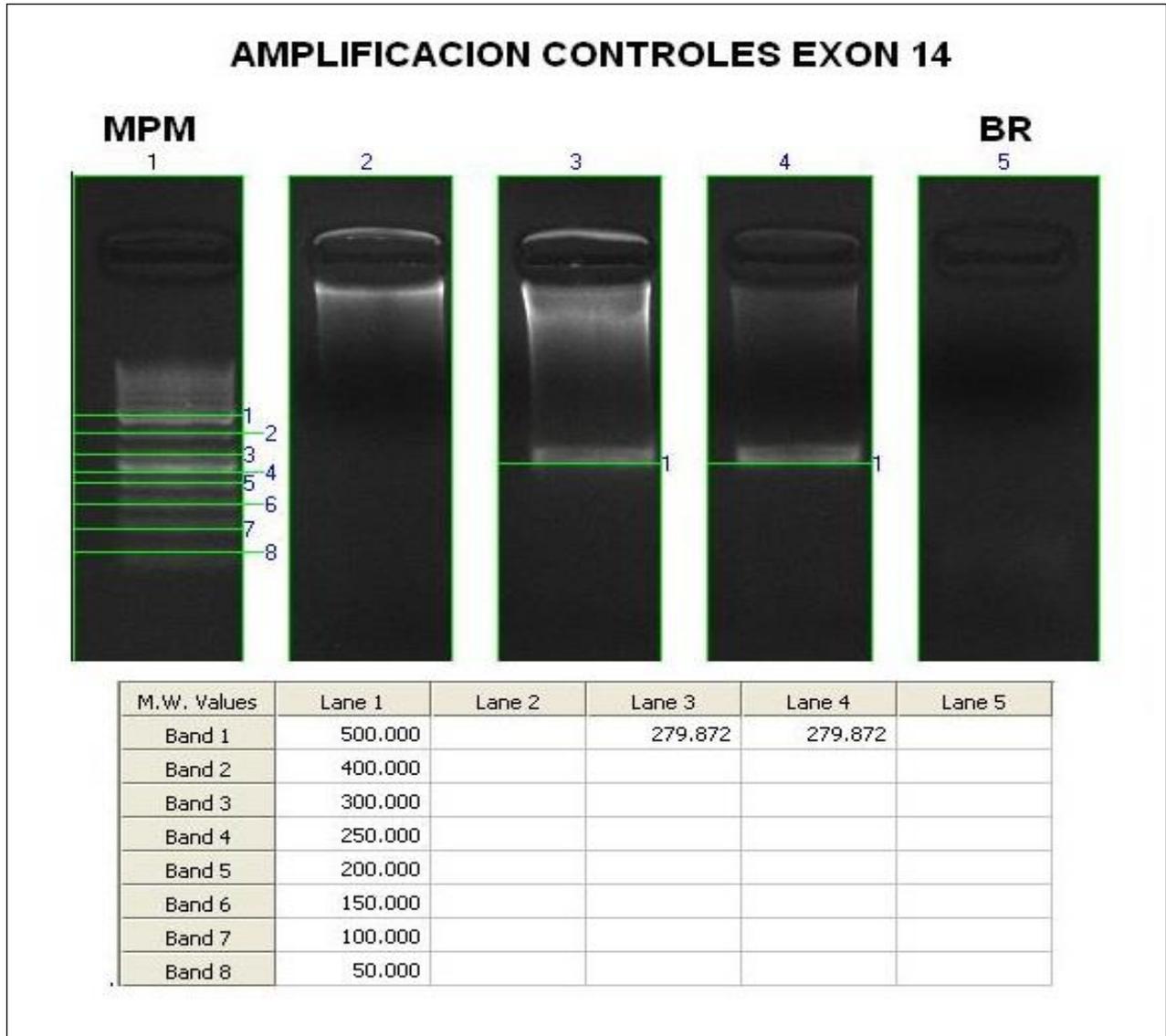


Figura 8. Amplificaciones de muestras control para reacción en cadena de la polimerasa del exón 14 del Factor XII.

En la figura 8 en los pozos 3 y 4 se observa la banda de amplificación obtenida luego del proceso de PCR, esta tiene un peso aproximado de 200 pares de bases (bp).

Digestión del producto amplificado Exón 14

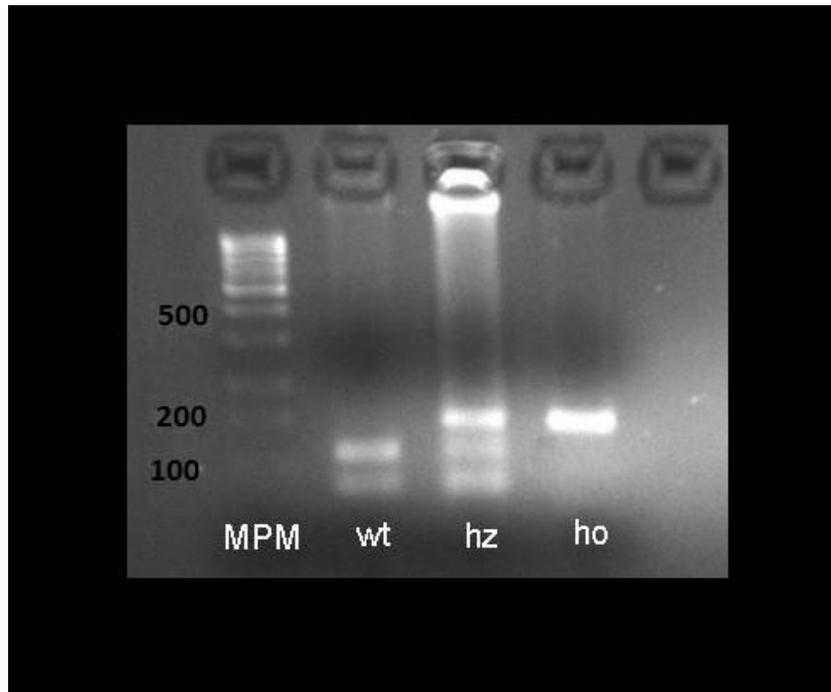


Figura 9. Digestión de muestras control para detección de la mutación 11396 G >A en el exón 14 del Factor XII

Para la digestión del producto amplificado en la PCR del exón 14 se empleó la enzima MvaI (BstNI) Fermentas, esta enzima de restricción reconoce la secuencia no mutada, por lo que en aquellas muestras con genotipo tipo silvestre (wt) se generan dos fragmentos con pesos aproximados a 50-100 bp y 100-150 bp, los heterocigotos (hz) presentan la banda de aproximadamente 200 bp, así como las de 50-100 bp y 100-150 bp, mientras que aquellos que sean homocigotos sólo presentarán la señal de aproximadamente 200bp ya que la enzima no reconoce y no efectúa el corte en la banda amplificada.

En la figura 9 se observa la digestión de los controles wt, hz y ho del exón 14, en el pocillo 1 se tiene un marcador de peso moléculas de 1000bp, en el pocillo 2 la muestra wt donde sólo se observa las dos señales, en el 3 la muestra hz con sus tres señales y en último pocillo la muestra ho con única señal.

Amplificación controles Exón 1

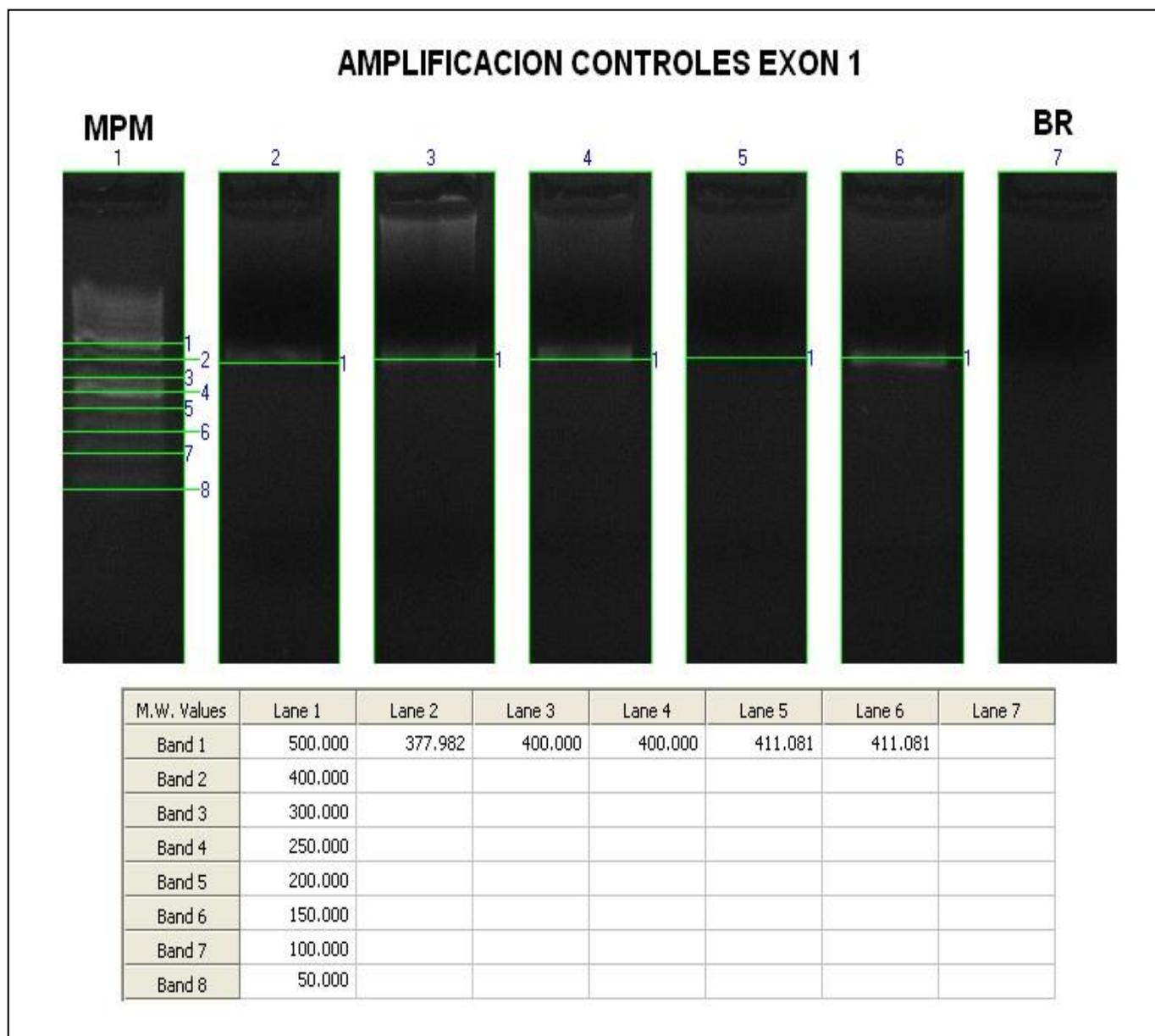


Figura 10. Amplificaciones de muestras control para reacción en cadena de la polimerasa del exón 1 del Factor XII.

La señal de amplificación obtenida luego del proceso de PCR del exón 1, tiene un peso aproximado de 370 - 400 pares de bases (bp) esta se observa en la figura 10.

Digestión del producto amplificado Exón 1

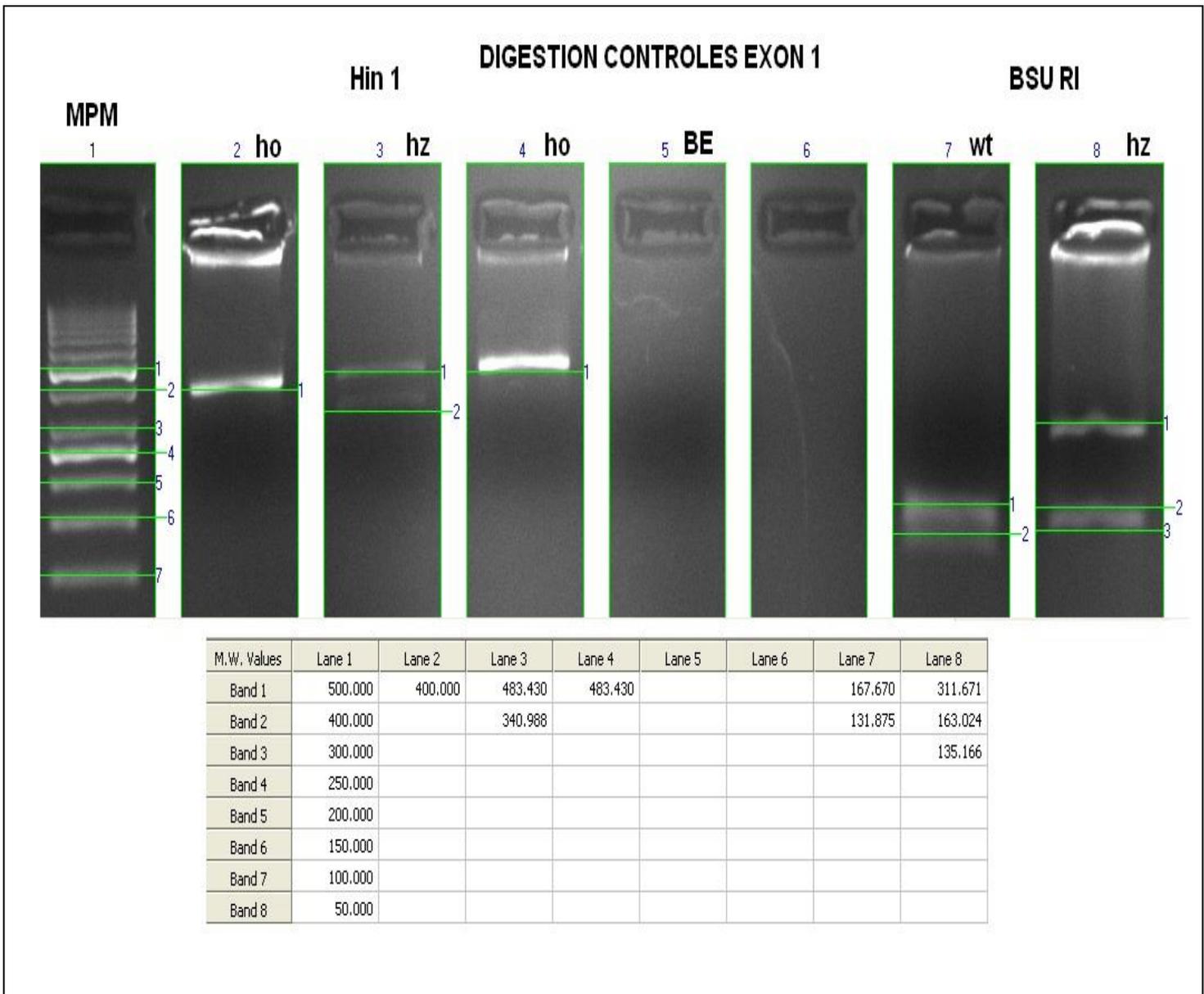


Figura 11. Digestión de muestras control para detección del polimorfismo 46 C >T y la mutación -8 G > C en el exón 1 del Factor XII.

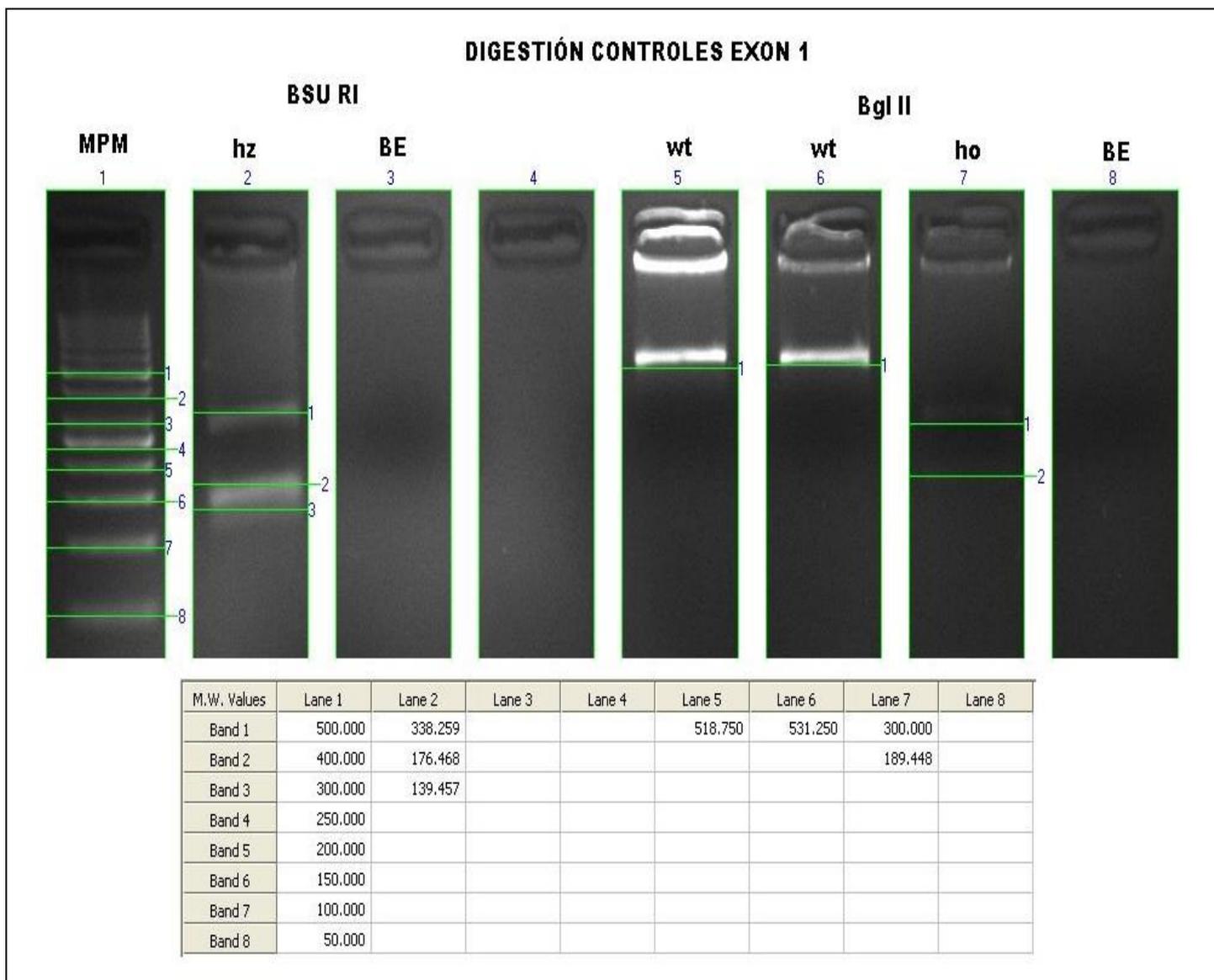


Figura 12. Digestión de muestras control para detección de la mutación -8 G> C y -13 C>T en el exón 1 del Factor XII.

El producto amplificado en la PCR del exón 1 fue tratado con 3 enzimas de restricción, la Hin 1 que permite detectar el polimorfismo 46 C >T, BSU RI para la mutación -8 G > C y BgI II para la mutación -13 C>T. En la figura 11 y 12 se observan los productos de digestión las enzimas Hin 1 y Bsu RI, estas reconocen la secuencia no mutada por lo que en caso de que el genotipo sea tipo silvestre se observan dos bandas, para el polimorfismo los pesos aproximados son de 250-300 bp y 80-100 bp mientras que en la BSU RI las dos bandas se ubican entre 100 bp y 150 bp. En caso de ser genotipo heterocigoto se observan 3 bandas, una banda mutada equivalente al producto amplificado que no es cortada, más las dos bandas del alelo no mutado con los pesos aproximados a los mencionados anteriormente. En el caso del pocillo del control

heterocigoto del polimorfismo no se observa la señal del fragmento de menor peso molecular, sin embargo en las muestras fue posible observar una débil señal.

Para la enzima BgI II que permite detectar la mutación -13 C>T el corte lo efectúa si la secuencia está mutada por tanto en el genotipo tipo silvestre (wt) se observa una sola banda equivalente al producto amplificado 370 bp - 400 bp, el homocigoto (ho) dos bandas con pesos entre 150bp y 250 bp y el genotipo heterocigoto (hz) con tres bandas una entre 370bp-400 y dos con pesos entre 150 bp y 250 bp. Para el caso de esta enzima sólo se contó con controles homocigotos y tipo silvestre.

Amplificación y digestión de muestras para detección de las mutaciones y el polimorfismo en los exones 1 y 14 del gen del Factor XII.

Muestras: Análisis del Exón 14 con enzimas de restricción.

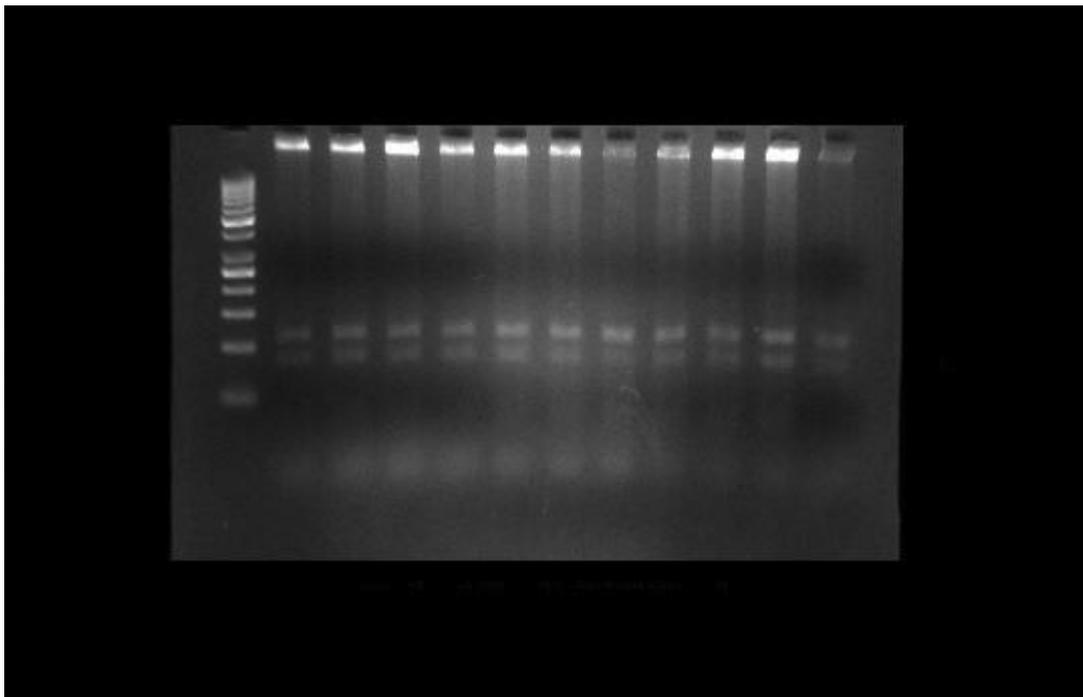
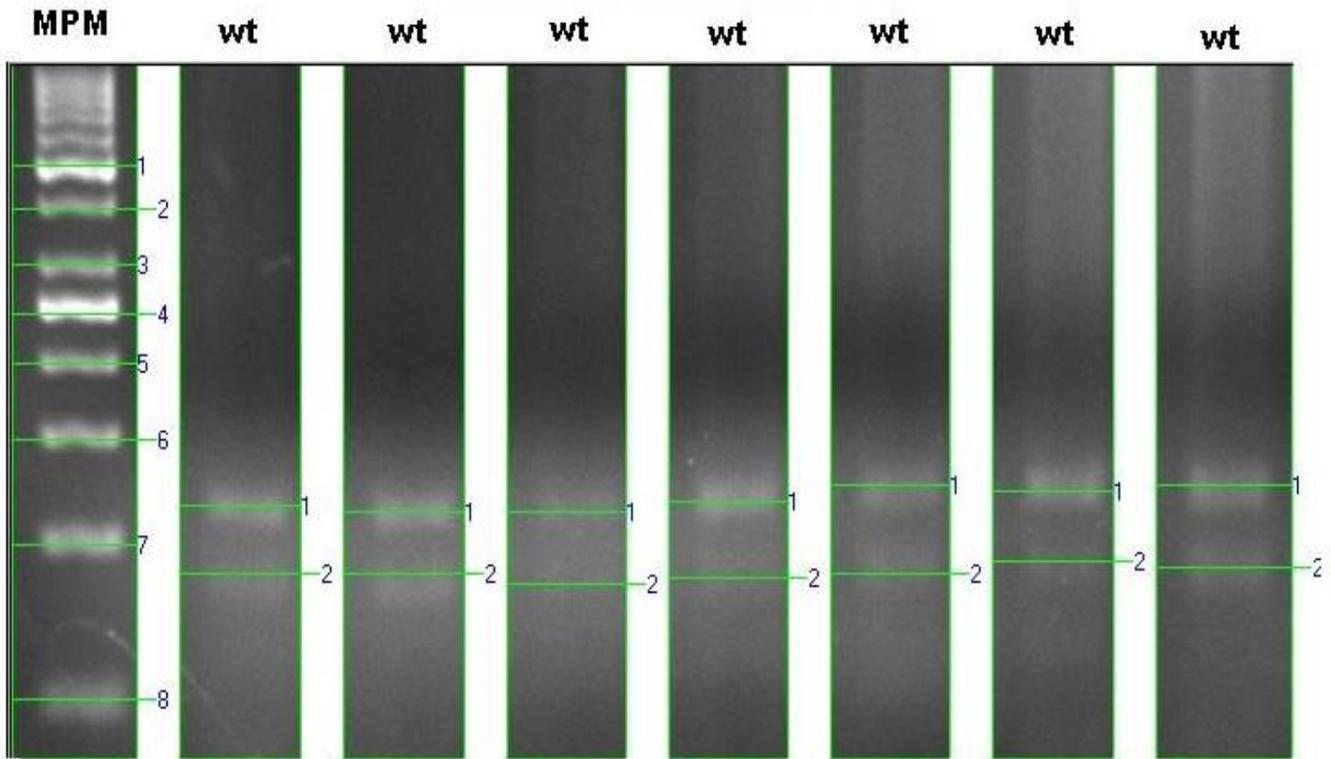


Figura 13. Digestión con enzima de restricción del producto amplificado en la reacción en cadena de la polimerasa del exón 14 del Factor XII.

Digestion Muestras Exon 14



M.W. Values	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5	Lane 6	Lane 7	Lane 8
Band 1	500.000	116.219	113.500	113.500	118.068	125.780	122.827	125.780
Band 2	400.000	89.320	89.320	85.718	87.867	89.320	93.784	91.532
Band 3	300.000							
Band 4	250.000							
Band 5	200.000							
Band 6	150.000							
Band 7	100.000							
Band 8	50.000							

Figura 14. Análisis del producto digerido con la enzima *MvaI* (*Bst* NI) para detección de la mutación 11396 G >A en el exón 14 del Factor XII.

En la figura 13 se observa un gel al 4% de digestión del producto amplificado en la PCR del exón 14 y en la figura 14 el análisis con el programa UVI - soft, todas las muestras son genotipo wt con sus respectivas bandas entre 50- 100 bp y 100 - 150 bp aproximadamente.

Muestras: Análisis del exón 1 con enzimas de restricción.

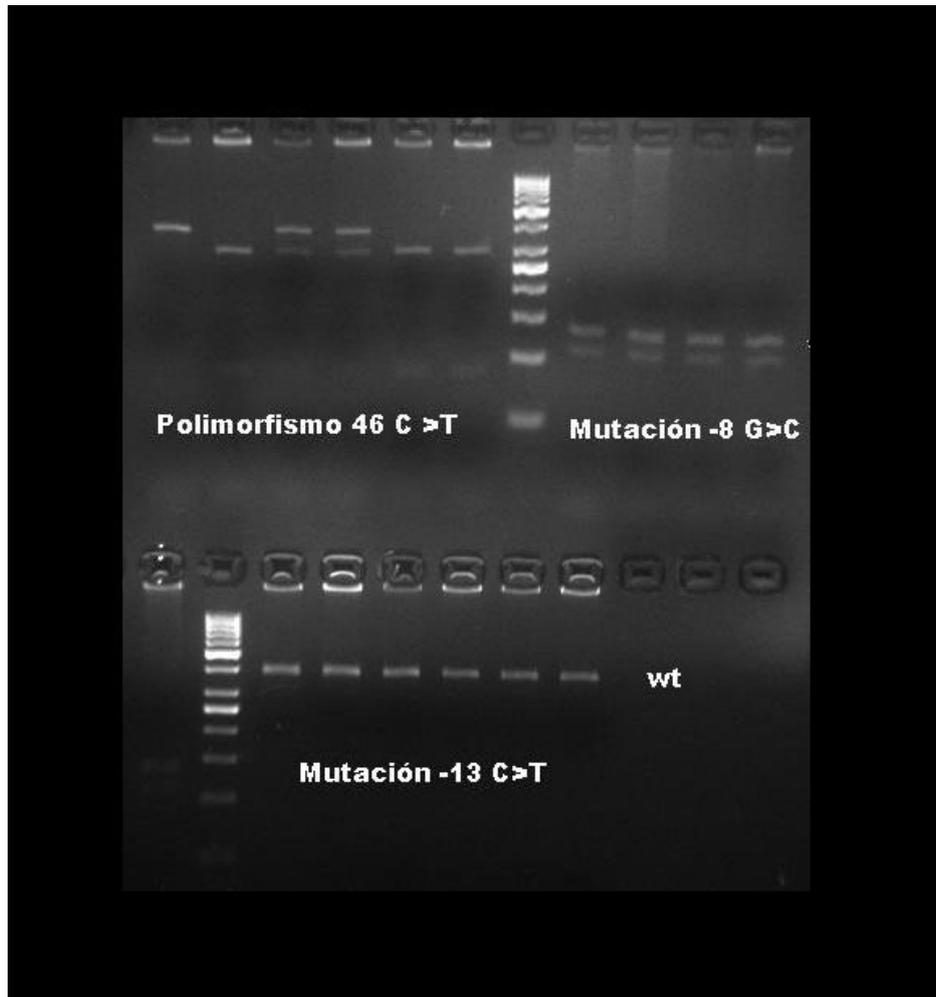
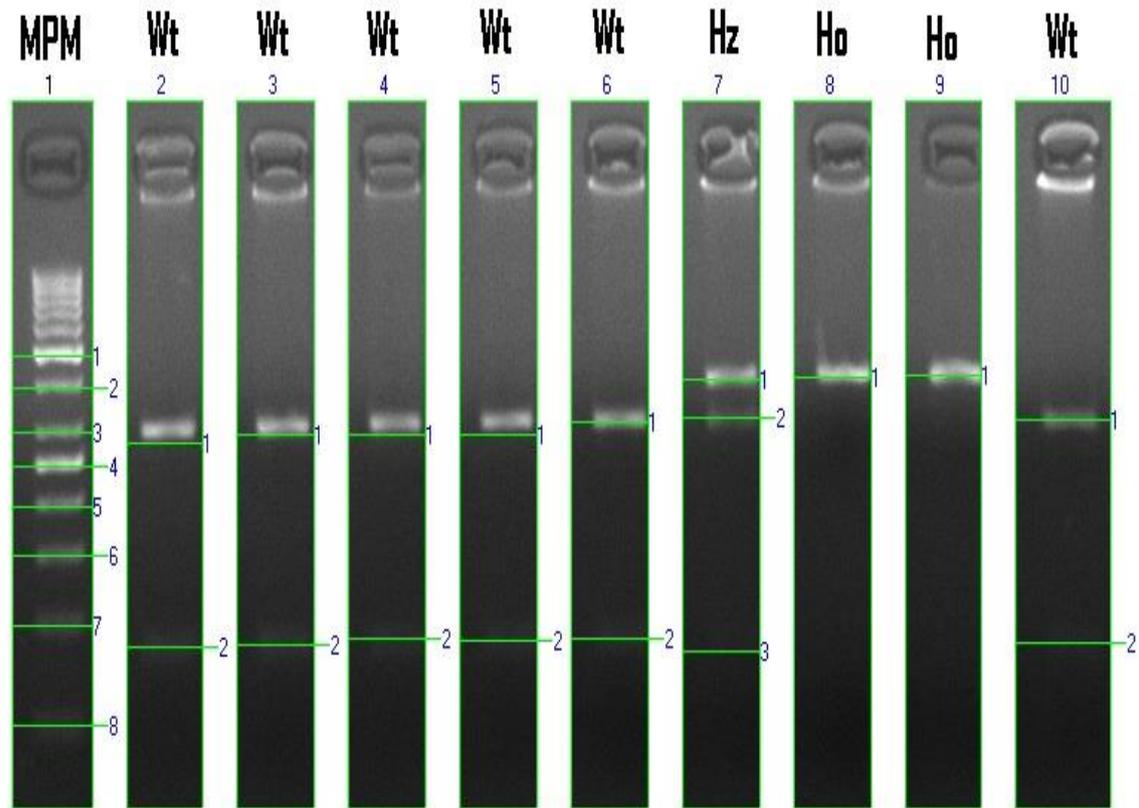


Figura 15. Digestión con enzimas de restricción del producto amplificado en la reacción en cadena de la polimerasa del exón 1 del Factor XII.

En la figura 15 se observa la digestión del producto amplificado en la PCR del exón 1 con las tres enzimas de restricción. Para el polimorfismo se observa el patrón de genotipo wt (pocillos 2, 5 y 6) así como ho (pocillo 1) y hz (3 y 4) presentes en la muestra en estudio, para las mutaciones -8 G>C y -13 C>T se observa solamente el genotipo wt.

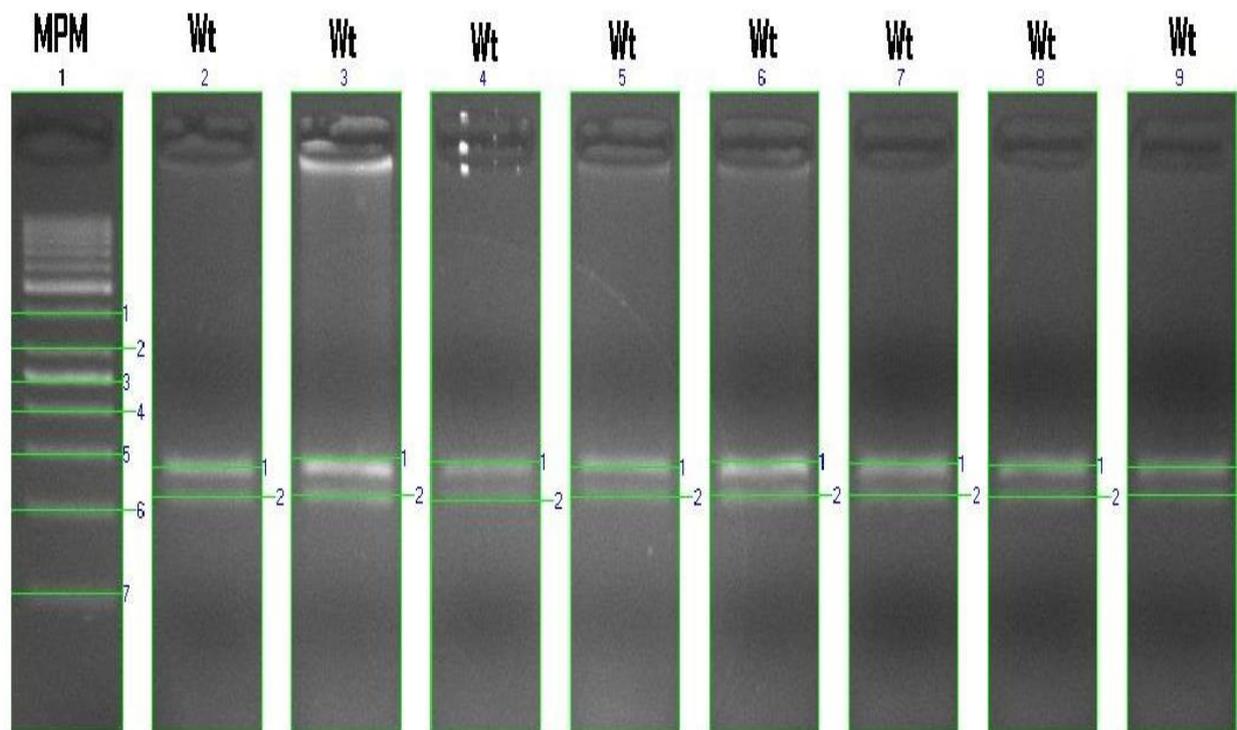
Digestión Muestras Exón 1 : Enzima Hin1I (Bsa HI)



M.W. Values	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5	Lane 6	Lane 7	Lane 8	Lane 9	Lane 10
Band 1	500.000	283.947	296.780	296.780	296.780	320.755	425.003	431.516	438.116	325.229
Band 2	400.000	88.230	89.367	92.829	91.666	92.829	329.794			90.512
Band 3	300.000						85.980			
Band 4	250.000									
Band 5	200.000									
Band 6	150.000									
Band 7	100.000									
Band 8	50.000									

Figura 16. Análisis del producto digerido con la enzima Hin1I (Bsa HI) para detección del polimorfismo 46 C> T en el exón 1 del Factor XII.

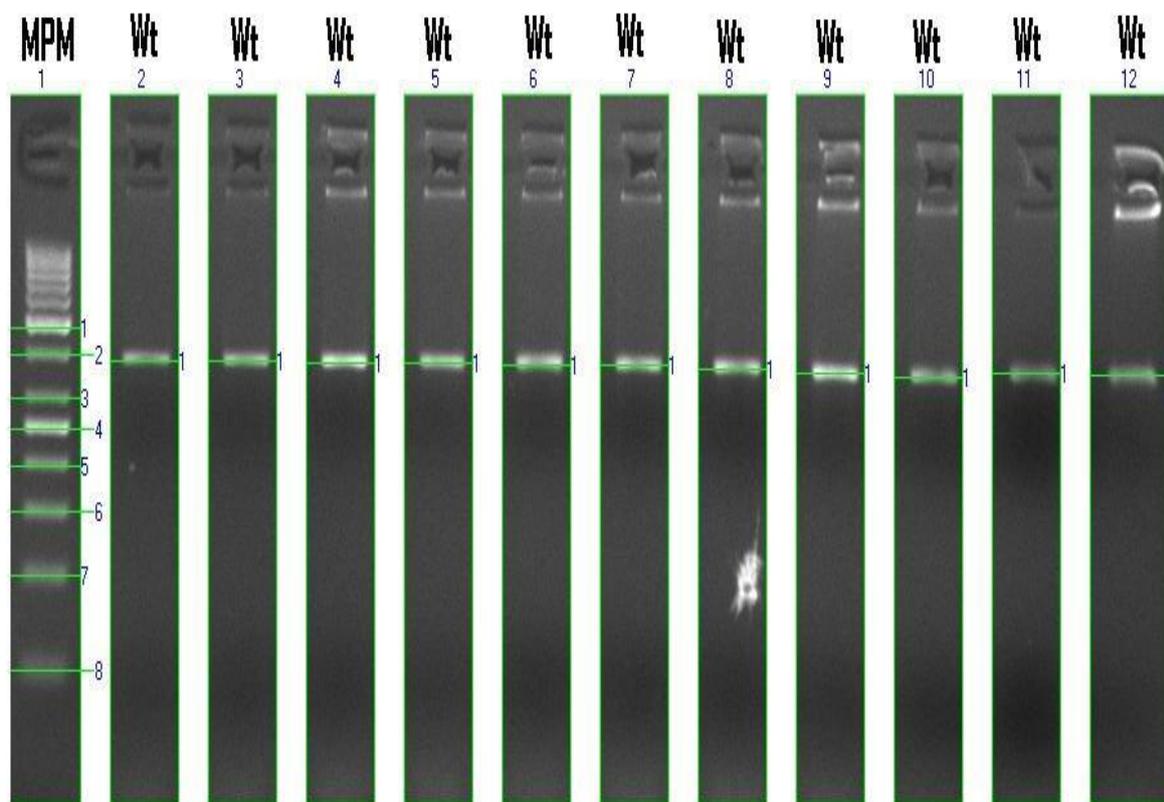
Digestión Muestras Exón 1: Enzima BSU RI (Hae III)



M.W. Values	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5	Lane 6	Lane 7	Lane 8	Lane 9	Lane 10
Band 1	500.000	186.628	196.064	192.221	186.628	192.221	190.334	188.470	186.628	184.809
Band 2	400.000	160.052	161.562	157.088	160.052	161.562	161.562	160.052	161.562	163.091
Band 3	300.000									
Band 4	250.000									
Band 5	200.000									
Band 6	150.000									
Band 7	100.000									

Figura 17. Análisis del producto digerido con la enzima BSU RI (Hae III) para detección del mutación -8 G> C en el exón 1 del Factor XII.

Digestión Muestras Exon 1: Enzimas Bgl II



M.W. Values	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5	Lane 6	Lane 7	Lane 8	Lane 9	Lane 10	Lane 11	Lane 12
Band 1	500.000	384.543	384.543	379.415	379.415	374.310	374.310	364.186	354.214	344.437	354.214	349.298
Band 2	400.000											
Band 3	300.000											
Band 4	250.000											
Band 5	200.000											
Band 6	150.000											
Band 7	100.000											
Band 8	50.000											

Figura 18. Análisis del producto digerido con la enzima Bgl II para detección del mutación -13 C>T en el exón 1 del Factor XII.

Las figuras 16, 17 y 18 muestran el análisis respectivo para cada una de las digestiones realizadas al producto amplificado en la PCR del exón 1.

Prevalencia de las mutaciones -8 G>C, -13 C>T, 11396 G >A y del polimorfismos 46 C >T en 100 muestras del banco de ADN del CIHATA.

Se tomaron 100 muestras pertenecientes al banco de ADN del CIHATA e inscritas al proyecto 807-A6-322 inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

A cada una de estas muestras se les realizó la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar un fragmento del exón 14 que contiene el sitio donde puede estar presente la mutación 11396 G >A y otra para amplificar una región del exón 1 donde están los sitios para las mutaciones -8 G>C, -13 C>T y del polimorfismo 46 C >T. Posterior a la amplificación se emplearon las enzimas de restricción mencionadas en Cuadro 2 para determinar el genotipo, homocigotos (ho), heterocigotos (hz) o tipo silvestre (wt) para cada una de las mutaciones y el polimorfismo en estudio.

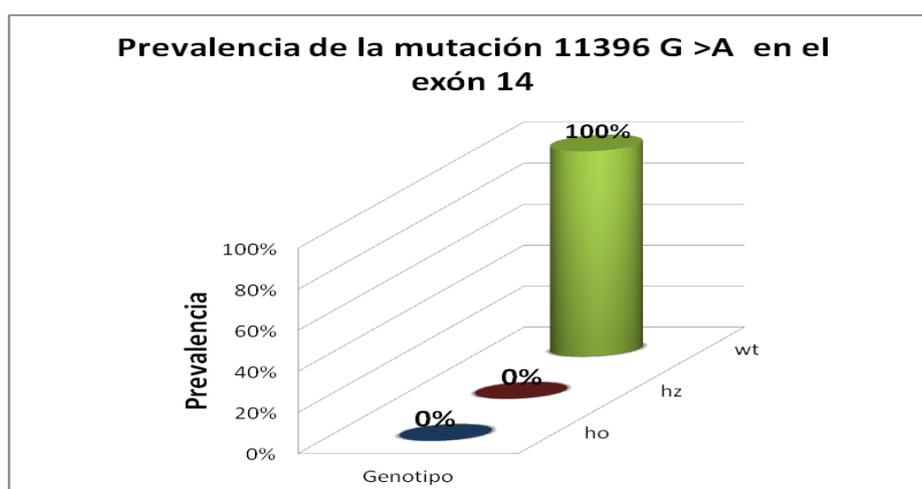


Figura 19. Prevalencia de la mutación 11396 G >A en el exón 14 del gen del FXII

La figura 19 presenta la prevalencia de la mutación 11396 G>A en el exón 14 del Factor XII, de las 100 muestras procesadas la totalidad es decir el 100% presentan genotipo tipo silvestre (wt).

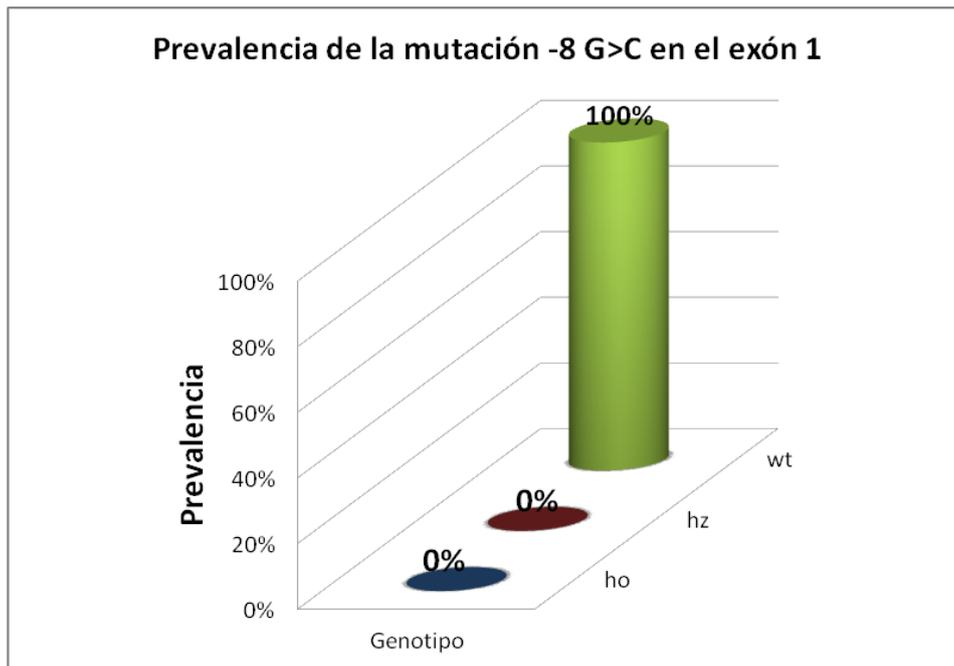


Figura 20. Prevalencia de la mutación -8 G>C en el exón 1 del gen del FXII.

En el caso de la mutación -8 G>C en el exón 1 del Factor XII la prevalencia de los genotipos se observa en la figura 20, donde el 100% presentan genotipo tipo silvestre (wt), 0% homocigoto (ho) y 0% heterocigoto (hz).

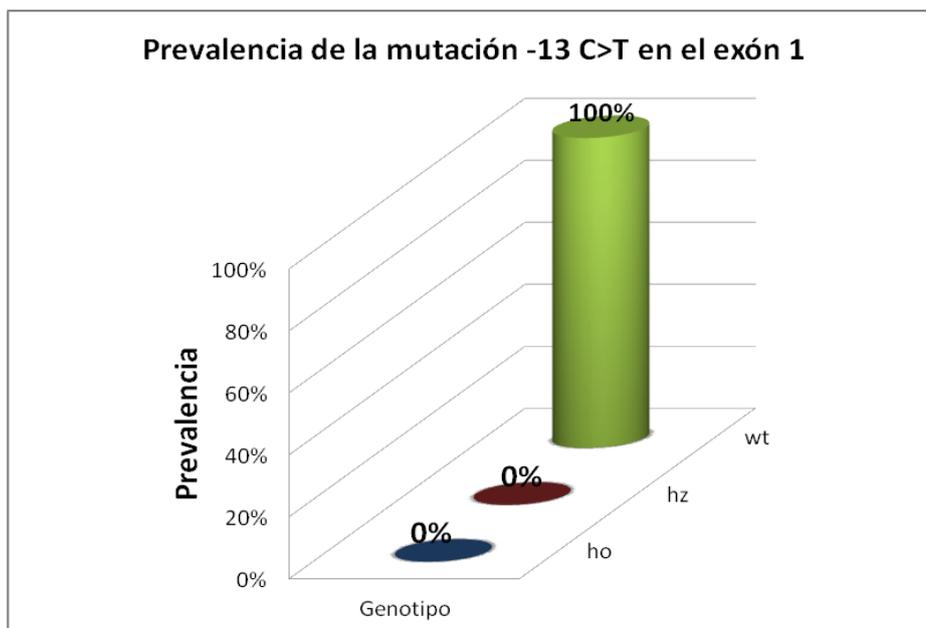


Figura 21. Prevalencia de la mutación -13 C>T en el exón 1 del gen del FXII.

La prevalencia de la mutación -13 C>T en el exón 1 del Factor XII se muestra en la figura 21, de las 100 muestras el 100% presentan genotipo tipo silvestre (wt), 0% el genotipo homocigoto (ho) y 0% heterocigoto (hz).

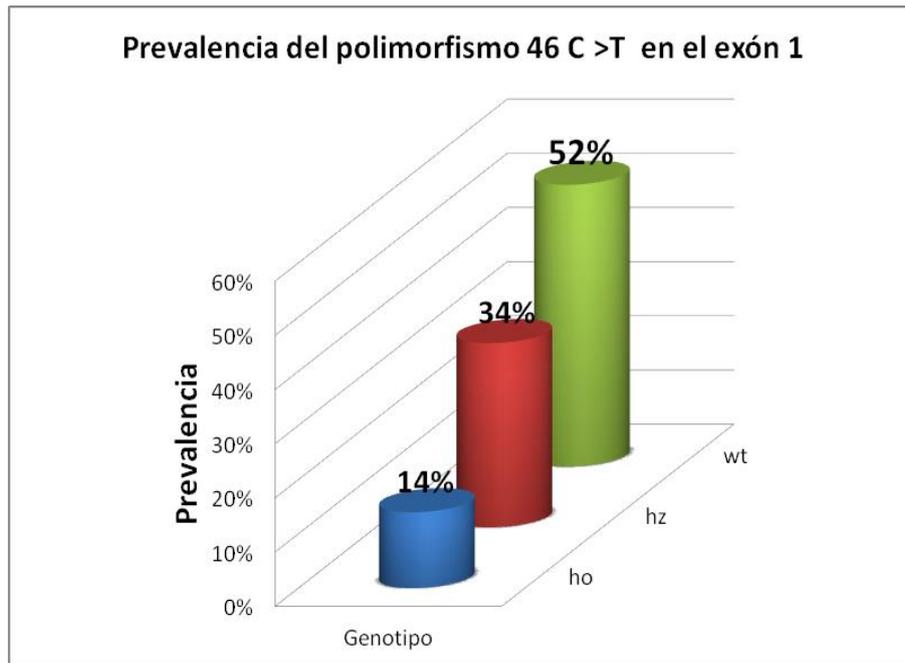


Figura 22. Prevalencia del polimorfismo 46 C > T en el exón 1 del gen del FXII

En la figura 22 se observa la prevalencia del polimorfismo 46 C > T ubicado en el exón 1 del gen, la distribución de los genotipo fue la siguiente: 14% homocigotos (ho), 34% heterocigotos (hz) y un 52 % tipo silvestre (wt).

DISCUSION

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica muy sensible cuyo éxito depende de las buenas prácticas de laboratorio, calidad de los reactivos, un balance entre las concentraciones de los reactivos empleados, en el caso de esta reacción: ADN, iniciadores, dNTPs, amortiguadores, iones de magnesio, una ADN polimerasa y DMSO, las temperaturas del proceso tanto en amplificación como en digestión y calidad en la preparación de geles de agarosa para visualizar el producto final.

Para la metodología empleada, el ADN se obtiene mediante un método de extracción con NaCl según Miller et al. (Ross et al., 1991), este procedimiento involucra pasos de lisis celular para liberar el material genético de la célula mediante sustancias como amortiguador lisis e involucra detergente como SDS, este paso genera restos celulares que posteriormente deben ser eliminados con sustancias como alcohol para dejar un ADN puro. Estos reactivos pueden ser inhibidores de la PCR por lo que es importante extraer material genético con gran pureza para obtener buenas amplificaciones (Rodríguez, 2004). La concentración de ADN también es importante para nuestro caso con un rango de concentraciones entre (10 - 100 ng/ μ L) se obtuvieron buenos resultados.

Las Taq polimerasa, enzima que lleva a cabo la reacción, emplea un amortiguador que contiene los reactivos necesarios para su adecuado funcionamiento estos pueden contener KCl o bien $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ sin MgCl_2 . El $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ incrementa la fuerza iónica de la reacción que altera la temperatura de desnaturalización y alineamiento del ADN y estimula la actividad enzimática (Morera, 2009) este fue el amortiguador elegido para la PCR a implementar a una concentración de 1X en el volumen de reacción y con el cual se obtuvo buena señal de amplificación

Esta enzima además requiere de un cofactor, este es el MgCl_2 , este reactivo se emplea generalmente en una concentración de 1.5 mM ya que en exceso puede inhibir la acción de la enzima o bien generar fragmentos inespecíficos cuando se añade poco reactivo. En el Cuadro 6 se muestra una curva variando las cantidades de MgCl_2 y de iniciadores para definir la cantidad de reactivo con la que se obtiene una mejor señal de amplificación. En la figura 3 y 4 se observan las bandas de amplificación obtenidas con las diferentes cantidades de MgCl_2 e iniciadores, la PCR 5 corresponde 2.5 μ L de MgCl_2 que corresponde a una concentración de 1.5 mM y 0.25 μ L de iniciadores para

una concentración de 0.5 mM en la reacción, bajo estas condiciones la señal de amplificación fue la mejor por lo que se decidió no modificar los volúmenes que fueron propuestos en la metodología inicial.

Los iniciadores son otro punto importante de controlar en una PCR. Si se emplea poca cantidad de iniciador el rendimiento de la reacción en cadena de la polimerasa es pobre mientras que un exceso de iniciadores pueden generar productos inespecíficos o bien formar dímeros entre ellos capaces de unirse al ADN impidiendo la amplificación del producto deseado (Rodríguez, 2004) como bien se mencionó anteriormente con la concentración de 0.5 mM en el volumen de reacción se obtuvieron buenos resultados.

Los dNTPs son capaces de atrapar magnesio repercutiendo en la acción de la Taq polimerasa cuando se usa gran cantidad, por tanto la concentración de reactivo a emplear en la reacción debe ser la adecuada (Van Pelt-Verkuil, 2008). Para la PCR efectuada no fue necesario cambiar la concentración planteada en la metodología, empleando la concentración de 1.25mM de dNTPs y 1.5 mM de MgCl₂ se mantiene un balance permitiéndole a la Taq polimerasa llevar a cabo su función.

Finalmente el agua utilizada debe ser bidestilada, libre de nucleótidos y el DMSO a una concentración entre 2%- 10% contribuye a reducir la estructura secundaria del ADN y a la amplificación de regiones con gran cantidad de guaninas y citosina. En esta PCR se emplea al 5%, es importante tener en cuenta que el uso de DMSO al 10% inhibe la actividad de la Taq polimerasa en un 50%. (Van Pelt-Verkuil, 2008).

El ciclo de amplificación descrito en la metodología de la PCR para ambos exones no fue necesario hacerle cambios en temperatura ni en tiempo, por lo que se trabajó con aproximadamente 30 ciclos con temperaturas de 94°C para desnaturalización del ADN, 60-63°C apareamiento y 72°C la extensión.

El análisis de los productos de restricción se llevó a cabo electroforesis en geles de agarosa. Como es descrito por (Hartl y Jone, 2005) la migración de los fragmentos de ADN cargados negativos, se da según el tamaño del poro del gel de agarosa, el cual depende de la concentración del gel. Con un gel al 1% fue posible visualizar el producto amplificado mediante PCR mientras que la concentración apta para visualizar los productos de digestión fue al 4% y no al 3%, debido a que el peso de estos fragmentos oscila entre 100bp -400 bp y según (Posso, 2009) la concentración de gel de agarosa a emplear es del 4% - 6% por esta razón con geles al 3% las bandas no tuvieron buena resolución.

Además las figuras 6 y 7 evidencian que los geles de agarosa no son lo suficientemente estables para prepararlos un día previo a su uso, sino que para correr los productos de digestión deben ser preparados y utilizados el mismo día para visualizar las bandas de digestión.

Una vez establecidas las concentraciones y condiciones necesarias óptimas para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa de exón 1 y 14 del Factor XII se montaron las muestras control.

En la figura 8 se observan los controles del exón 14, al someter estos a la PCR y correr el producto amplificado en un gel de agarosa al 1% junto con el marcador de peso molecular nos permite estimar el peso aproximado de la banda amplificada, una vez amplificados se llevo a cabo la digestión con la enzima de restricción MvaI (BstNI) cuyos productos se visualizan en un gel al 4% ,se corre junto con un marcador de peso molecular que permita establecer el peso aproximado de las bandas (ver figura 9) y de esta manera determinar el genotipo tipo silvestre, heterocigoto u homocigoto.

En la figura 10 se muestra la amplificación de los controles del exón 1 al igual que con el exón 14 se corren los productos en un gel de agarosa al 1% junto a un marcador de peso molecular. Los productos de amplificación fueron digeridos pero en este caso con tres diferentes enzimas de restricción (ver figura 11) se corrió en un gel de agarosa al 4% y se estima el peso de las bandas para cada uno de los genotipos de las tres enzimas de restricción.

Es importante tener presente que a pesar de llevar a cabo las corridas electroforéticas en un gel a la misma concentración, durante un mismo tiempo y bajo un voltaje constante no todos los geles corren exactamente igual por tanto al analizar el gel con el software el peso asignado a las señales por el programa Uvi soft es un aproximado, no todas la señales van a marcar exactamente el mismo peso o bien coincidir exacto con los pesos moleculares dados en el Cuadro 2.

Al implementar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), procesar las muestras control y establecer un aproximado de cuales son los pesos moleculares de las señales generadas por las enzimas de restricción empleadas para la detección de las 3 mutaciones y el polimorfismo en el gen del FXII, fue posible llevar a cabo la PCR para el exón 1 y 14 a cada una de las 100 muestras así como la digestión con enzimas de restricción una para el exón 14 y tres para el exón 1, analizar cada una de ellas y

determinar el genotipo para las mutaciones 11369 G>A, -8G>C, -13 C>T y el polimorfismo 46 C>T.

La figura 19 presenta un gráfico con la prevalencias de la mutación 11396 G>A en el exón 14 del Factor XII. El 100% de las muestras presentan genotipo tipo silvestre (wt) lo que quiere decir que la mutación está ausente, no hay cambio de una guanina (G) por la adenina (A) por lo que la secuencia de aminoácidos codificada por este exón se encuentra normal.

En el exón 1 del gen del FXII como bien se ha mencionado previamente se estudiaron 2 mutaciones y un polimorfismo. En la figura 20 se observa la prevalencia de la mutación -8G>C la cual es del 0%, el 100% de las muestras presentan un genotipo tipo silvestre descartándose la presencia del sitio de restricción aberrante al menos para las muestras analizadas (Schloesser et al.,1997).

La prevalencia de la mutación -13 C>T se observa en la figura 21. Esta mutación al igual que las dos mencionadas anteriormente se encuentra ausente en la muestra, es decir la prevalencia es del 0%, siendo todas las muestras tipo silvestre por lo tanto se descarta una posible alteración del sitio de unión del factor transcripcional HNF4- α encargo de regular la expresión del gen FXII (Schloesser et al.,1997).

La figura 22 muestra la prevalencia del polimorfismo 46 C>T obteniéndose un prevalencia mayor respecto a las mutaciones. Para este polimorfismo la prevalencia es de 14% para el genotipo homocigoto, 34% heterocigoto y 52% tipo silvestre, ante estos resultados podemos afirmar que en la muestra en estudio el polimorfismo descrito está presente y si se compara con la prevalencia en población caucásica dada por la literatura se duplica la prevalencia de homocigotos (7%) y se aumenta un poco la prevalencia heterocigota (29%).

La condición o el genotipo tipo silvestre (C/C) se refiere a que no existen cambios en la secuencia del gen por lo tanto el gen codifica por una proteína completamente normal. En el caso de un heterocigota (C/T) en uno de los alelos del gen se dio la sustitución de nucleótido en la posición 46 cambiándose una citosina (C) por timina (T), mientras que los homocigotos (T/T) tienen la sustitución de nucleótido en ambos alelos del gen, cambiando la secuencia Kozak lo que afecta directamente a traducción proteica al impedirle al ribosoma reconocer la secuencia AUG para iniciar el proceso de traducción, es por esta razón que se genera un péptido de sólo 2 aminoácidos (Ros et al., 2005).

Según la literatura existe asociación significativa entre el genotipo y los niveles plasmáticos de FXII (Bach et al., 2007) por tanto es de esperar que el 34% con genotipo hz y el 14% con genotipo ho presenten niveles plasmáticos de FXII y FXIIa menores respecto al tipo silvestre, donde la traducción proteica genera una proteína funcional. Además como consecuencia de la disminución de los niveles plasmáticos de FXII la vía intrínseca de la coagulación desencadena por el FXII en conjunto con una carga negativa, la precalicreína y el cininógeno de alto peso molecular toma más tiempo en generar la trombina, lo que conduce a obtener el tiempo parcial de tromboplastina aumentado (TTP).

La deficiencia del factor de contacto (FXII) se asocia a riesgo trombótico (Duarte, 2007). Esto se debe a que la fracción α -FXII que se produce cuando el FXII es activado, es la encargada de escindir la precalicreína para formar calicreína la que a su vez induce la liberación del activador tisular del plasminógeno (t-PA), este activador escinde la pro urocinasa y forma urocinasa que es la encargada de activar el plasminógeno en plasmina que es la que finalmente lisa el coágulo que se formó con la activación de las cascada de la coagulación (Schloesser et al.,1997), es por esta razón que aquellas personas homocigotas o heterocigotas para el polimorfismo 46 C>T tiene una actividad fibrinolítica disminuida, por tanto el riesgo trombótico aumenta en estos genotipos.

Es importante tener presente que la trombosis es una enfermedad que prevalece y que para ella se han definido factores de riesgo trombogénicos. Muchos de los pacientes con o sin antecedentes trombóticos acuden al CIHATA a realizarse pruebas de análisis de proteínas anticoagulantes o bien de factores genéticos y en algunos casos los resultados son proteínas anticoagulantes con una función normal y genotipo tipo silvestre para los factores genéticos. Con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se evidencia la presencia del genotipo homocigoto y heterocigoto para el polimorfismo 46 C>T por lo tanto esta PCR se convierte en una herramienta más que el centro de investigación le puede ofrecer a sus pacientes.

CONCLUSIONES

Con el presente estudio fue posible establecer bajo que condiciones se logra obtener buenos resultados en la reacción en cadena de la polimerasa, para el estudio del exón 1 y 14 del FXII, por lo que es posible implementar la técnica en el Centro de Investigación en Hematología y Trastornos Afines (CIHATA).

La prevalencia de las mutaciones 11396 G >A en el exón 14 y las mutaciones -8 G>C, -13 C>T en el exón 1 fue del 0% no así para el polimorfismo 46 C >T en el exón 1. En Costa Rica no existen estudios y datos sobre la prevalencia de mutaciones y polimorfismos en el gen del FXII, sin embargo con una pequeña muestra fue posible establecer la prevalencia del genotipo para el polimorfismo 46 C>T. Un 14% para el genotipo homocigoto, 34% para el heterocigoto y 52% para el tipo silvestre con esto se demuestra que el polimorfismo esta presente en nuestra población.

En la población costarricense la enfermedad trombótica es prevalente por tanto este polimorfismo puede sumarse a la gran variedad de factores predisponentes a sufrir de eventos trombóticos, dado que la deficiencia en el Factor XII de la cascada de la coagulación se ha asociado a riesgo trombótico.

Con este estudio se abre la posibilidad de llevar a cabo estudios de asociación, donde se analizan casos y controles, comparando la presencia del polimorfismo en individuos sanos (controles) y enfermos (casos) de esta manera se puede relacionar entre un polimorfismo genético y la aparición de la trombosis.

Por otra parte sería de gran valor para estudios posteriores cuantificar los niveles plasmáticos de FXII así como determinar el tiempo parcial de tromboplastina (TTP) en los individuos con genotipo homocigoto y heterocigoto para confirmar por experiencia del propio laboratorio que efectivamente existe relación entre el polimorfismo y niveles plasmáticos del factor XII.

Finalmente es importante tener presente que el consejo genético que se puede brindar a los pacientes a partir de la implementación de técnicas en biología molecular ha cobrado importancia por tanto ampliar los conocimientos sobre la deficiencia del FXII es nuestro país es de gran valor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bach, J., Endler, G., Winkelmann, B., Boehm, O., Maerz, W., Mannhalter, C., Hellstern, P. (2008). Coagulation factor XII (FXII) activity, activated FXII, distribution of FXII C46T gene polymorphism and coronary risk. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6, 291-296.
2. Bayona, H., Martpinez, C., Gómez, A. (2010). La coagulación normal. Un enfoque práctico para el neurólogo. *Acta Neurol Colomb*, 26, 16-24.
3. Bryant, J., Shariat-Madar, Z. (2009). Human Plasma Kallikrein-Kinin System: Physiological and Biochemical Parameters. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 7(3), 234-250.
4. Chaves, L., Salazar, L., Brilla, A., Hermann, F. (2002). Estudio de factores trombogénicos en pacientes menores de 45 años con infarto del miocardio. *Rev Costarr Cardiol*, 4(5), 5-10.
5. Cool, D., Macgillivray, R. (1987). Characterization of the Human Blood Coagulation Factor XII gene, intron/exón gene organization and analysis of the 5'-flanking region. *The Journal of biological chemistry*, 262(28), 13662-13673.
6. Duarte, M. (2007). Coagulación: sistema biológico complejo. *Revista Colombiana de Filosofía de la Ciencia*: 8, 83-95.
7. García, V. (2004). El equilibrio hemostático, un proceso complejo y dinámico. *Haematologica (ed. esp)*: 89(1), 87-96.
8. Hartl, D., Jones, E. (2005). Cap 2: DNA Structure and DNA Manipulation. En *Genetics analysis of genes and genomes*. pp. 53-57
9. Johnson, C., Tuite, A., Morange, P., Tregouet, D., Gagnon, F. (2010). The Factor XII -4 C >T Variant and Risk of Common Thrombotic Disorders: A Huge Review and Meta-Analysis of evidence from Observational studies. *American Journal of Epidemiology*: 173(2), 136-144.

10. Kanaji, T., Okamura, T., Osaki, K., Kuroiwa, M., et al. (1998). A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'- Untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood*, 91 (6), 2010-2014.
11. Kitchens, C. (2002). The Contact System. *Arch Pathol Lab Med*, 126, 1382-1386.
12. Montero, C., Monge, T. (2010). Patología de la Trombosis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamerica LXVII*, 591, 73-75.
13. Mordillo, C., Martínez, E., Fontcuberta, J., Soría, J. (2007). Molecular Analysis of multiple genetic variants in Spanish FXII- deficient families. *Haematologica/the hematology journal*, 92(11), 1569-1572.
14. Morera, J. (2009). Tesis: Estandarización de una PCR-RFLP v para la determinación genética de tres polimorfismos de la enzima paraoxonasa1 (PON1) en niños costarricenses con leucemia linfocítica aguda. Instituto Tecnológico de Costa Rica. pp1-52
15. Oguchi, S., Ishii, K., Moriki, T., et al. (2005). Factor XII Shizuoka, a novel mutation (Ala 392 Thr) identified and characterized in a patient with congenital coagulation factor XII deficiency. *Thrombosis Research*, 115, 191-197.
16. Páramo, J., Panizo, E., Pegenaute, C., Lecumberri, R. (2009). Coagulación 2009: una visión moderna de la Hemostasia. *Revista Médica de la Universidad de Navarra*, 53(1), 19-23.
17. Posso, D. (2009). Electroforesis del ADN en geles de agarosa. Protocolos de Laboratorio UEG, 01-04
18. Pucci, J. (2001). Tratamiento de la trombosis venosa profunda con heparina de bajo peso molecular: impacto económico, seguridad y eficacia. *Revista costarricense cardiología*, 3(2), 04-05.
19. Rodríguez, I, Barrera, H. (2004). La Reacción en Cadena de la Polimerasa dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 3, 323-335.

20. Ros, P., Corral, J., Roldan, V., Marín, F., Vicente, V., González, R. (2005). Polimorfismos en la región Kozak del FXII y su relación con el infarto agudo de miocardio prematuro. *Clin Invest Arterioscl*, 3, 122-129
21. Ross, J., Garret, N., Holden, K. (1991). DNA isolation from small tissue samples using salt and spermine. *Nucleic Acids Research*, 19(21), 6053.
22. Ruiz, G. (2009). Cap 18 Mecanismos Hemostáticos. En *Fundamentos de Hematología México*. Editorial Médica Panamericana. pp. 230-245.
23. Sáenz, G. (2008). Biología Molecular aplicada a la hematología. En *Hematología Analítica tomo I*. pp. 447-457.
24. Sáenz, G. (2008). Mecanismo normal de la hemostasia. En *Hematología Analítica tomo I*. pp. 497-502.
25. Satz, L. (1993). La reacción en cadena de la polimerasa, el método y sus aplicaciones. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy*, 4(23) www.cienciahoy.org.ar
26. Schloesser, M., Zeerleder, S., Lutze, G., Halbmayer, W et al. (1997). Mutations in the Human Factor XII gene. *Blood*, 90(10), 3967-3977.
27. Soria, J. (2009). El componente genético de las alteraciones de la coagulación y de la trombosis. *Revista Española cardiología Suplemento*, 9, 58B-65B.
28. Undas, A., Brummel, K., Mann, G. (2004). Statins and Blood Coagulation. *Arterioscler thromb vasc boil*, 25, 287-294.
29. Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., Hays, J. (2008). Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. 1 ed. Springer Science.
30. Walch, K., Riener, E., Tempfer, C., Endler, G., Huber, J., Unfried, G. (2005). *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 112, 1434-1436.
31. Zito, F., Lowe, G., Rumley, A., McMahon, A., Humphries, E. (2002). Association of the factor XII 46C> T polymorphism with risk of coronary heart disease (CHD) in the WOSCOPS study. *Atherosclerosis*, 165, 153-158.