

## **Validação de Amostras Coletadas no Sistema de Citologia Líquida CellPreserv® (Kolplast) para Detecção de Perfil de Trombofilia por Biologia Molecular**

### **Introdução**

A trombofilia caracteriza uma tendência à ocorrência de trombose decorrente de alterações hereditárias ou adquiridas da coagulação ou da fibrinólise, que levam a um estado pró-trombótico.

As trombofilias hereditárias são causadas por uma anormalidade hereditária que predispõe à oclusão vascular, mas que requer a interação com outro componente, hereditário ou adquirido, para desencadear o episódio trombótico. As trombofilias hereditárias são decorrentes de alterações ligadas aos inibidores fisiológicos da coagulação (antitrombina, proteína C, proteína S e resistência à proteína C ativada) ou de mutações de fatores da coagulação (FV G1691A ou Fator V Leiden e mutação G20210A da protrombina).

Clinicamente, as trombofilias hereditárias geralmente manifestam-se como tromboembolismos venosos, mas com algumas características próprias: a) ocorrência em indivíduos jovens (< 45 anos); b) recorrência frequente; c) história familiar de eventos trombóticos; d) trombose migratória ou difusa ou em local pouco comum, e e) episódio trombótico desproporcionalmente grave em relação ao estímulo desencadeante. Os defeitos trombolíticos podem também causar várias complicações obstétricas, como dificuldade para engravidar, gestações complicadas, retardo do crescimento fetal, abortamentos e perdas fetais.

O Fator V de Leiden é a mutação G1691A no gene que codifica o Fator V. O gene mutante, localizado no cromossomo 1, promove uma alteração no Fator V tornando-o mais resistente à ação da proteína C (anticoagulante natural). Vários estudos já demonstraram sua correlação com resultados gestacionais insatisfatórios.

O Fator II ou Protrombina é a mutação G20210A no gene que codifica o fator II e está correlacionada a um risco elevado de tromboembolismo, porque tal mutação irá proporcionar uma maior produção de Fator II (coagulante). Portadores da mutação do Fator II apresentam uma elevação no risco de trombose em cerca de 2 a 5 vezes. Estudo recente mostrou a presença da mutação no gene da protombina em torno de

7 a 8% das pacientes com abortos quando comparado com 3,8% de mulheres sem história de aborto.

A mutação do gene que codifica a enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR) na posição C677T promove uma alteração na estrutura desta enzima, deixando-a inativa. Recentemente, foi descoberta uma nova mutação que promove inativação da MTHFR na posição A1298C, porém ainda há poucos estudos que a correlacionam com resultados gestacionais insatisfatórios. A MTHFR é uma enzima fundamental na conversão de homocisteína em metionina, e nesse processo estão envolvidos outros cofatores, como ácido fólico, vitamina B6 e B12. Indivíduos que apresentam mutação da MTHFR possuem uma tendência à elevação dos níveis de homocisteína sanguínea, principalmente os homozigotos para C677T, ou heterozigotos para ambas as mutações. Hiperhomocisteinemia parece estar relacionada com um risco elevado para doenças cardiovasculares e maus resultados gestacionais (aborto recorrente, pré-eclampsia, óbito fetal, DPP). A mutação na MTHFR também está relacionada com mal-formações fetais, defeitos de fechamento do tubo neural. Em alguns estudos, pacientes com hiperhomocisteinemia apresentaram um risco de aborto 2,5 vezes maior que a população normal.

O Perfil de Trombofilia é um exame que compreende a detecção das mutações Fator V de Leiden, Fator II Protrombina e MTHFR nas posições 677 e 1298 utilizando-se a metodologia de PCR em Tempo Real.

## **Objetivos**

O objetivo desta validação é verificar se o coletor CellPreserv® (Kolplast) possui algum componente que iniba ou altere o resultado previamente conhecido da detecção do Perfil de Trombofilia em espécimes cérvico-vaginais coletados neste meio de preservação quando submetidos à uma reação de PCR em tempo real específica para as mutações G1691A (Fator V de Leiden), G20210A (Fator II – Protrombina), C677T (Metilenotetrahidrofolato redutase – MTHFR) e A1298C (Metilenotetrahidrofolato redutase – MTHFR).

## **Materiais e Métodos**

A validação de amostras coletadas no coletor CellPreserv para detecção destas quatro mutações utilizou 20 amostras de sangue total em EDTA de uma população assintomática para eventos trombóticos que foram utilizadas como padrão-ouro para estabelecer os genótipos de cada uma das mutações nestes indivíduos. Estes mesmos 20 indivíduos realizaram uma coleta de escovado bucal em 6 ml de meio de preservação CellPreserv. Os escovados bucais foram mantidos em temperatura ambiente por um período compreendido entre 24 e 72 horas e depois foram processados. Todos os pacientes entenderam e aceitaram os termos desta validação através da assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os kits reagentes utilizado para a detecção do Perfil de Trombofilias por PCR em Tempo Real nesta validação foram o TaqMan SNP Genotyping Assays Fator V Leiden, TaqMan SNP Genotyping Assays Fator II Protrombina, TaqMan SNP Genotyping Assays MTHFR 677 e TaqMan SNP Genotyping Assays MTHFR 1298, da Life Technologies.

### **Protocolo de Processamento de Amostras de Sangue Total em EDTA para Detecção do Perfil de Trombofilias (Life Technologies)**

- As amostras de sangue total em EDTA dos 20 indivíduos que participaram desta validação e extraídas no equipamento automatizado *Magna Pure Compact* (ROCHE).
- A reação de PCR para cada um dos alvos pesquisados – Fator V de Leiden, Fator II Protrombina, MTHFR 677 e MTHFR 1298, é processada juntamente com 2 NTC para cada alvo e um controle já conhecido previamente.
- O modo de ciclagem utilizado foi o Dual Hidrólise Probes oferecido pelo z480 (Roche), utilizando os canais de fluorescência de FAM (465-510) e de VIC/HEX (540-580).

## **Protocolo de Processamento de Amostras de Células Bucais Coletadas em Coletor CellPreserv® (Kolplast) para Detecção do Perfil de Trombofilias (LifeTechnologies)**

- As amostras de escovado bucal coletadas em coletor CellPreserv® (Kolplast) são agitadas em Vortex em um tubo Falcon devidamente etiquetado. Todas as amostras foram previamente concentradas através de centrifugação e obtenção de pellet celular. Após a centrifugação, todo o sobrenadante é descartado e o pellet formado é ressuspendido em 1 ml de PBS pH 7,2.
- A extração do DNA das amostras de sangue total é realizada de maneira completamente automatizada, utilizando o equipamento *Magna Pure Compact* (ROCHE).
- A reação de PCR para cada um dos alvos pesquisados – Fator V de Leiden, Fator II Protrombina, MTHFR 677 e MTHFR 1298, é processada juntamente com 2 NTC para cada alvo e um controle já conhecido previamente.
- O modo de ciclagem utilizado foi o Dual Hidrólise Probes oferecido pelo z480 (Roche), utilizando os canais de fluorescência de FAM (465-510) e de VIC/HEX (540-580).

### **Resultados**

- Os resultados esperados para cada mutação são os seguintes:
  - Não Portador ou Homozigoto Normal (notado nas tabelas como **Homo Normal**),
  - Portador Heterozigoto ou Heterozigoto (notado nas tabelas como **Heterozigoto**),
  - Portador Homozigoto ou Homozigoto Mutado (notado nas tabelas como **Homo Mutado**).
- Os resultados obtidos nesta validação estão ilustrados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4:

Tabela 1: Comparação entre os resultados do Fator V de Leiden detectados por PCR em tempo real de amostras de sangue total e de escovados bucais em CellPreserv® (Kolplast)

Paciente	Resultado Sangue	CellPreserv
1	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
2	Homo normal	Homo normal
3	Homo normal	Homo normal
4	Homo normal	Homo normal
5	Homo normal	Homo normal
6	Homo normal	Homo normal
7	Homo normal	Homo normal
8	Homo normal	Homo normal
9	Homo normal	Homo normal
10	Homo normal	Homo normal
11	Homo normal	Homo normal
12	Homo normal	Homo normal
13	Homo normal	Homo normal
14	Homo normal	Homo normal
15	Homo normal	Homo normal
16	Homo normal	Homo normal
17	Homo normal	Homo normal
18	Homo normal	Homo normal
19	Homo normal	Homo normal
20	Homo normal	Homo normal

Tabela 2: Comparação entre os resultados do Fator II - Protrombina detectados por PCR em tempo real de amostras de sangue total e de escovados bucais em CellPreserv® (Kolplast)

Paciente	Resultado Sangue	CellPreserv
1	Homo normal	Homo normal
2	Homo normal	Homo normal
3	Homo normal	Homo normal
4	Homo normal	Homo normal
5	Homo normal	Homo normal
6	Homo normal	Homo normal
7	Homo normal	Homo normal
8	Homo normal	Homo normal
9	Homo normal	Homo normal
10	Homo normal	Homo normal
11	Homo normal	Homo normal
12	Homo normal	Homo normal
13	Homo normal	Homo normal
14	Homo normal	Homo normal
15	Homo normal	Homo normal
16	Homo normal	Homo normal
17	Homo normal	Homo normal
18	Homo normal	Homo normal
19	Homo normal	Homo normal
20	Homo normal	Homo normal

Tabela 3: Comparação entre os resultados do MTHFR na posição 677 detectados por PCR em tempo real de amostras de sangue total e de escovados bucais em CellPreserv® (Kolplast)

Paciente	Resultado Sangue	CellPreserv
1	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
2	Homo mutado	Homo mutado
3	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
4	Homo normal	Homo normal
5	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
6	Homo normal	Homo normal
7	Homo normal	Homo normal
8	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
9	Homo normal	Homo normal
10	Homo normal	Homo normal
11	Homo normal	Homo normal
12	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
13	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
14	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
15	Homo mutado	Homo mutado
16	Homo normal	Homo normal
17	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
18	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
19	Homo normal	Homo normal
20	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>

Tabela 4: Comparação entre os resultados do MTHFR na posição 1298 detectados por PCR em tempo real de amostras de sangue total e de escovados bucais em CellPreserv® (Kolplast)

Paciente	Resultado Sangue	CellPreserv
1	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
2	Homo normal	Homo normal
3	Homo normal	Homo normal
4	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
5	Homo normal	Homo normal
6	Homo normal	Homo normal
7	Homo normal	Homo normal
8	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
9	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
10	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
11	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
12	Homo normal	Homo normal
13	Homo normal	Homo normal
14	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
15	Homo normal	Homo normal
16	Homo normal	Homo normal
17	<b>Heterozigoto</b>	<b>Heterozigoto</b>
18	Homo normal	Homo normal
19	Homo normal	Homo normal
20	Homo normal	Homo normal

- Houve 100% de concordância entre os resultados das quatro mutações que compõem o perfil de trombofilias (Fator V de Leiden, Fator II Protrombina, MTHFR 677 e MTHFR 1298) que foram originados pelas amostras de sangue total (considerado o padrão-ouro) e os resultados que foram originados pelas amostras de escovado bucal coletadas em meio de preservação CellPreserv® (Kolplast).

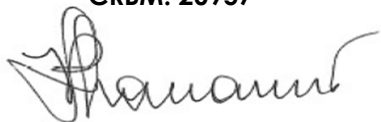


## Conclusão

- O coletor CellPreserv® (Kolplast) foi validado para a detecção por PCR em tempo real utilizando os kits TaqMan SNP Genotyping Assays específicos para Fator V de Leiden, Fator II Protrombina, MTHFR 677 e MTHFR 1298, **desde que a extração do DNA das amostras seja realizada após a centrifugação dos escovados e a subsequente substituição do meio de preservação por PBS pH 7,2 antes do procedimento de extração.**
- Em experimentos anteriores a esta validação, quando as amostras coletadas em CellPreserv® (Kolplast) foram extraídas diretamente sem o passo de substituição do meio de preservação por PBS pH 7,2, o desempenho do DNA extraído na detecção do Perfil de Trombofilias não foi satisfatório. Logo, parece existir algum componente na formulação do CellPreserv® (Kolplast) que torna obrigatória a substituição do meio de preservação por PBS pH 7,2.

**Patricia Thomann**

**CRBM: 20957**



**Fernanda Dahrouge Chiarot**

**CRBM: 10628**

