

UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

RED BIBLIOTECARIA MATÍAS

DERECHOS DE PUBLICACIÓN

DEL REGLAMENTO DE GRADUACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

Capítulo VI, Art. 46

“Los documentos finales de investigación serán propiedad de la Universidad para fines de divulgación”

PUBLICADO BAJO LA LICENCIA CREATIVE COMMONS

Reconocimiento 4.0 Unported.

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



“Se permite cualquier explotación de la obra, incluyendo una finalidad comercial, así como la creación de obras derivadas, la distribución de las cuales también está permitida sin ninguna restricción.”

Para cualquier otro uso se debe solicitar el permiso a la Universidad

UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DR. LUIS EDMUNDO VÁSQUEZ
ESCUELA DE MEDICINA



UNIVERSIDAD DR. JOSÉ
MATÍAS DELGADO
SAN SALVADOR, EL SALVADOR C. A.

Variantes genéticas del Factor V y Protrombina presentes en
pacientes salvadoreños con Trombosis Venosa Profunda y su
relevancia clínica

Tesis presentada para optar al título de Doctorado en Medicina

Por

Castillo Escobar, Juan Alfredo
Mejía Bautista, Melissa Alejandra
Sosa Soto, Giordano José

Asesora:

Lic. María Isabel Giménez M.Sc.

Antiguo Cuscatlán, La Libertad, El Salvador, 20 de enero de 2017



UNIVERSIDAD DR. JOSÉ
MATÍAS DELGADO
SAN SALVADOR, EL SALVADOR C. A.

Dr. David Escobar Galindo

RECTOR

Dr. José Enrique Sorto Campell

VICERRECTOR ACADEMICO

Dr. José Nicolás Astacio Soria

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DR. LUIS EDMUNDO VASQUEZ

COMITÉ EVALUADOR

Dr. José Roberto Fernández.

PRESIDENTE COMITÉ EVALUADOR

Dra. Tatiana Guadalupe Ascencio

COMITÉ EVALUADOR

Dra. Leonor Murillo de Linares

COMITÉ EVALUADOR

Lic. María Isabel Giménez M.Sc.

ASESORA

Antiguo Cuscatlán, La Libertad, El Salvador, 20 de enero de 2017

ACTA DE EVALUACIÓN DE DOCUMENTO ESCRITO DE TESIS POR EL JURADO

En la ESCUELA DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD de la UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO a las 12 horas con 15 minutos del día 19 del mes de enero de 2017 reunidos los suscritos miembros del jurado examinador de la Tesis de Grado titulada:

TEMA:

Variantes genéticas del Factor V y Protrombina presentes en pacientes salvadoreños con Trombosis Venosa Profunda y su relevancia clínica

Presentada por el (los) la (s) egresados(as):

1. Juan Alfredo Castillo Escobar
2. Melissa Alejandra Mejía Bautista
3. Giordano José Sosa Soto

Para optar al Grado de:

DOCTORADO EN MEDICINA

Respectivamente

HACE CONSTAR QUE: Habiendo revisado y evaluado en forma individual su contenido escrito, de conformidad al Art. 41, 42 y 43 del Reglamento de Graduación

ACORDARON DECLARARLA:

- APROBADA SIN OBSERVACIONES
 APROBADA CON OBSERVACIONES
 REPROBADA

No habiendo más que hacer constar, damos por terminada la presente acta que firmamos, entregando el original a la Secretaría de esta Unidad Académica.

Dr. Jose Roberto Fernandez Castillo

Presidente

Dra. Leonor Murillo de Linares

Primer Vocal



Dra. Tatiana Ascencio Menjivar

Segundo Vocal

Agradecimientos

A Dios, por brindarnos la perseverancia y la paciencia para cumplir nuestras metas.

A nuestros padres, por ser el motor que nos impulsó en nuestro caminar.

A nuestras familias, por su apoyo incondicional y comprensión durante estos años.

A nuestra asesora, Lic. María Isabel Giménez, por su completa entrega, su dedicación a este proyecto, su tiempo y sus palabras de aliento.

Al Dr. William Hoyos, por su gran capacidad para crear ideas, innovar e inspirarnos.

A los Dres. Rodolfo Ancheta, José Rodríguez, Omar Callejas y Arturo González por brindarnos su confianza y apoyo para trabajar de la mano con sus pacientes.

A nuestros profesores de la Escuela de Medicina, por su paciencia y entrega durante 8 años, tengan por seguro que han dejado huella.

Índice

| | |
|---|----|
| Resumen | 1 |
| Introducción | 2 |
| Capítulo I..... | 3 |
| 1.1 Planteamiento del Problema | 3 |
| 1.2 Justificación | 5 |
| 1.3 Objetivos..... | 7 |
| Objetivo General | 7 |
| Objetivos Específicos | 7 |
| Capítulo II..... | 8 |
| Fundamentos teóricos | 8 |
| 2.1 Hemostasia | 8 |
| 2.2 Cascada de coagulación | 8 |
| 2.3 Tríada de Virchow | 8 |
| 2.4 Estados de Hipercoagulabilidad..... | 9 |
| 2.5 Mutaciones Asociadas a Hipercoagulabilidad | 10 |
| 2.6 Diagnóstico genético | 13 |
| 2.9 Importancia del Diagnóstico Genético..... | 15 |
| 2.10 Evaluación Clínica | 16 |
| Capítulo III..... | 17 |
| Operacionalización de Variables | 17 |
| Capítulo IV | 20 |
| Metodología | 20 |
| 4.1 Tipo de Investigación..... | 20 |
| 4.2 Universo, Población y Muestra | 20 |
| 4.3 Muestreo | 20 |
| 4.4 Criterios de Inclusión y Exclusión | 20 |
| 4.5 Materiales y métodos..... | 21 |
| 4.7 Consideraciones éticas..... | 24 |
| Capítulo V | 26 |
| Resultados..... | 26 |
| 5.1 Caracterización demográfica de la población con trombosis venosa profunda. | 26 |
| 5.2 Frecuencia relativa de variantes de los genes codificantes para el Factor V y la Protrombina en la población estudiada..... | 28 |

| | |
|---|----|
| 5.3 Condición clínica y relación con hallazgos genéticos | 29 |
| Discusión | 34 |
| Limitantes del estudio | 38 |
| Capítulo VI | 40 |
| Conclusiones | 40 |
| Recomendaciones..... | 41 |
| Glosario | 42 |
| Anexos | 44 |
| Factores Heredados o Adquiridos de Trombosis Venosa..... | 44 |
| Consentimiento Informado..... | 45 |
| Ficha Clínica | 49 |
| Protocolo de extracción de ADN..... | 51 |
| Gel de agarosa (Confirmación de extracción de ADN por electroforesis) | 53 |
| Gel de agarosa (Confirmación de PCR por electroforesis)..... | 54 |
| Protocolo de hibridación | 55 |
| Interpretación de tiras reactivas Kit ThromboType | 57 |
| Tiras reactivas del Kit ThromboType | 58 |
| Aprobación del Comité de Ética del ISSS | 61 |
| Referencias bibliográficas | 62 |

Resumen

INTRODUCCIÓN. La Trombosis Venosa Profunda es de etiología multifactorial y no todos los pacientes presentan la misma susceptibilidad para presentar esta condición. Existen mutaciones genéticas que predisponen a un estado de hipercoagulabilidad, siendo las más comúnmente descritas Factor V Leiden y Protrombina G20210A.

OBJETIVO. Determinar si están presentes dichas mutaciones en pacientes salvadoreños con diagnóstico de TVP y analizar las implicaciones clínicas de los hallazgos.

METODOLOGÍA. Estudio descriptivo de corte transversal con un muestreo no probabilístico por conveniencia. Se obtuvo una muestra de 38 pacientes, de quienes se obtuvo una muestra de sangre venosa para extracción de ADN y posterior hibridación reversa en tiras reactivas. Se analizaron los datos en Microsoft Excel y arreglos posteriores en GraphPad Prism 6.0.

RESULTADOS. De los 38 pacientes a los que se le realizó el test genético, el 100% presentó la variante *wild type* para ambos genes. No se encontraron las variantes mutadas en heterocigosidad ni homocigosidad.

CONCLUSIONES. La gran diversidad genotípica de las poblaciones latinoamericanas vuelve necesarios los estudios que determinen el grado de penetrancia de alelos específicos considerados factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades. Este estudio ha contribuido a demostrar que en el país existen las condiciones necesarias para realizar pruebas para detectar alteraciones genéticas asociadas con diversas patologías y que deben realizarse inicialmente estudios para evaluar la conveniencia de introducir en una población cierto test genético con fines diagnósticos.

Introducción

Los métodos diagnósticos utilizados en la práctica clínica se encuentran en constante descubrimiento y evolución. En las últimas décadas, la invención de técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación reversa de ácidos nucleicos, entre otros, han permitido la identificación de múltiples alteraciones genéticas que conllevan un riesgo aumentado de presentar condiciones patológicas durante la vida de una persona.

Por medio de estos métodos, se han llegado a determinar mutaciones en los genes que codifican proteínas participantes en la cascada de coagulación, que alteran el funcionamiento adecuado de la hemostasia. De estas mutaciones, las más comunes son el Factor V Leiden y la Protrombina G20210A, siendo ambas factores que aumentan de manera importante el riesgo para desarrollar Trombosis Venosa Profunda (TVP) y/o Tromboembolismo Pulmonar (TEP)¹. Existen actualmente recomendaciones clínicas para la búsqueda de dichas mutaciones en diferentes poblaciones, pero para poder extrapolar su uso a El Salvador deben conocerse las características intrínsecas propias de esta población en particular^{2,3}.

En el desarrollo del presente trabajo se ha realizado por primera vez en nuestro país una búsqueda por medio de técnicas de biología molecular de las mutaciones mencionadas anteriormente, en un grupo de pacientes salvadoreños con diagnóstico de TVP. Se pretende que este estudio sirva como un punto de partida para futuros esfuerzos que incluyan estadística inferencial y analítica, permitiendo elaborar recomendaciones clínicas en relación a la búsqueda de estos factores de riesgo, los cuales estén basados en evidencia científica que tome en cuenta las variantes genéticas presentes en nuestra población.

Capítulo I

1.1 Planteamiento del Problema

La trombofilia es un conjunto de alteraciones de diversa etiología que predisponen a una respuesta anormal en la función plaquetaria y de los factores de la coagulación, alterando así la hemostasia del sistema vascular. Una de sus manifestaciones principales, la trombosis venosa profunda (TVP), consiste en la formación de un coágulo en una vena de gran calibre, usualmente en los miembros inferiores a nivel de las piernas, muslos o pelvis, aunque también pueden producirse en los miembros superiores⁴.

Actualmente, la TVP se ha convertido en un problema tanto para la salud pública como para la práctica médica, ya que, según estimaciones realizadas, a nivel mundial la incidencia en la población general es de 1.92 casos por 1000 habitantes/año, presentando una tasa mayor en hombres que en mujeres y un incremento en ambos sexos al aumentar la edad⁵. En Estados Unidos la incidencia anual es de 1 a 2 casos por 1000 habitantes⁴, presentándose la mayor incidencia en personas de raza blanca (1.17 por cada 1000) y la menor en personas de raza hispana (0.61 por cada 1000 casos)⁶.

La mayoría de los cuadros clínicos son asintomáticos, no obstante, una anamnesis adecuada permite identificar los factores de riesgo adquiridos que predisponen al desarrollo de esta entidad, cuya fisiopatología se resume mediante la tríada de Virchow: estasis sanguínea, hipercoagulabilidad y daño endotelial^{5,7}. Una vez realizado el diagnóstico, es el médico tratante quien escoge la opción terapéutica más adecuada según las características del paciente, que puede ser el uso de heparinas o anticoagulantes orales o una combinación de ambos⁸.

Sin embargo, es preciso recordar que la trombosis es de etiología multifactorial y que no todos los pacientes presentan la misma susceptibilidad para desarrollar esta enfermedad, lo cual se debe a condiciones de salud (obesidad, diabetes, etc.), a factores adquiridos (trauma, inmovilización, etc.) y a factores intrínsecos que principalmente incluyen las mutaciones de genes que predisponen al paciente a un estado de hipercoagulabilidad; dentro de las mutaciones más frecuentemente encontradas se describen el Factor V Leiden (FVL) y la mutación G20210A del gen de la protrombina (PT), entre otros⁹.

La prevalencia de estas mutaciones es variable en poblaciones con disímiles rasgos genéticos. El FVL, la causa más común de trombofilia hereditaria, es posiblemente una alteración genética originada en etnias de procedencia europea, en donde la prevalencia de esta mutación en la población general varía desde un 15% en los países nórdicos y Grecia, hasta un 2% en la Europa Mediterránea. En Oriente Medio se han encontrado prevalencias de 12-14% en Jordania y Líbano, mientras que en Asia, África y Australia se considera actualmente inexistente. Se han estudiado poblaciones de Hispano-estadounidenses en donde se estima que la prevalencia es del 2.2% en personas sanas sin antecedentes de trombosis^{10,11}.

Existe poca información sobre la presencia de la mutación FVL en poblaciones latinoamericanas: en un estudio de casos y controles realizado en Chile se determinó una prevalencia de 1.3% en la población general y de 5.4% en pacientes con TVP, mientras que en la población mestiza de México se ha descrito la presencia del FVL en 10.8% de pacientes con enfermedad trombótica^{12,13}.

La mutación PT G20210A se considera la segunda variante genética más relacionada con el desarrollo de eventos trombóticos y/o tromboembólicos. Dicha mutación causa un aumento de los niveles plasmáticos de protrombina, y está presente en un 5.3% de la población

general mediterránea española¹⁴. En Latinoamérica es poca la información disponible sobre la presencia de esta mutación; en Chile, mediante un estudio de casos y controles, se ha estimado que tiene una prevalencia del 5.4% en personas con antecedente de TVP y en México una prevalencia de 13.5% en pacientes con enfermedad trombotica^{13,15}.

A nivel centroamericano los estudios sobre la prevalencia de estas mutaciones en pacientes con TVP no existen o no se encuentran publicados, por lo que considerando lo anteriormente expuesto surge la siguiente interrogante: ¿están presentes las mutaciones Factor V Leiden y Protrombina G20210A en pacientes salvadoreños con diagnóstico de TVP?

1.2 Justificación

El diagnóstico de alteraciones genéticas que representan factores de riesgo para determinadas enfermedades se ha convertido en un campo en constante expansión dentro de la práctica médica en los últimos años. Las mutaciones en los genes codificantes para algunos factores de coagulación generan condiciones protrombóticas que, aunadas a factores exógenos, aumentan el riesgo de apareamiento de TVP en estos pacientes.

Los factores heredados asociados con desórdenes clínicos hemorrágicos han sido estudiados por siglos. En contraste, la base genética de la trombosis ha sido reconocida más recientemente. Desde la década de los noventa se han identificado las trombofilias heredadas (desórdenes de hipercoagulabilidad) más prevalentes: el Factor V Leiden y la mutación del gen de Protrombina^{16, 17}. Previamente habían sido identificados otros factores hereditarios asociados a riesgo de trombosis, tales como: la mutación del gen de Metilentetrahidrofolato reductasa, la deficiencia de antitrombina III, y la deficiencia de la proteína C y proteína S³.

Según la *American College of Medical Genetics*, se justifica la determinación de estas mutaciones en poblaciones específicas: con apareamiento de TVP por primera vez antes de

los 50 años o bien después de los 50 años de edad sin haber presencia de malignidad, TVP en sitios inusuales (vasos cerebrales, mesentéricos o hepáticos), TVP recurrente, TVP durante el embarazo, en el período postparto o en mujeres que toman anticonceptivos orales o que están bajo terapia de reemplazo hormonal, mujeres con abortos inexplicables, y familiares adultos asintomáticos de pacientes con TVP documentada¹². En estos pacientes, el diagnóstico de mutaciones genéticas trombofílicas es un pilar en la evaluación integral del riesgo de recurrencia y morbilidad por TVP a corto y largo plazo.

En la actualidad, se han realizado esfuerzos para implementar el diagnóstico molecular en El Salvador, procurando la disponibilidad de técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Aquí se propone, además, utilizar la hibridación de ácidos nucleicos para complementar el primer estudio de material genético humano en el país. Ambas técnicas requieren el manejo de muestras biológicas en condiciones óptimas y brindan resultados en corto tiempo.

Con el presente estudio se pretende inaugurar una línea de investigación que serviría como punto de partida para explorar algunos de los métodos diagnósticos moleculares que, en un futuro próximo, podrían comenzar a apoyar la práctica médica en la prevención de las complicaciones en los trastornos de hipercoagulabilidad en nuestro país.

A pesar de que muchos recursos se han enfocado en la terapéutica de la TVP, en El Salvador no se ha tipificado la carga ni el papel que representan las mutaciones genéticas en la fisiopatología de las enfermedades trombóticas y tromboembólicas. El presente estudio no pretende determinar la prevalencia de las variantes genéticas en la población salvadoreña en general, pero es un punto de partida para futuros esfuerzos en este ámbito.

1.3 Objetivos

Objetivo General

- Determinar si están presentes las mutaciones Factor V Leiden y Protrombina G20210A en sujetos salvadoreños con diagnóstico de Trombosis Venosa Profunda y analizar las implicaciones clínicas de los hallazgos.

Objetivos Específicos

- Caracterizar demográficamente a la población con diagnóstico de TVP participante en el estudio.
- Identificar la frecuencia relativa de las variantes genéticas de los genes en la muestra poblacional estudiada.
- Determinar la frecuencia de heterocigosidad y homocigosidad para las mutaciones de los genes estudiados y analizar la relación que tienen con la condición clínica de los pacientes.
- Identificar si las mutaciones genéticas estudiadas se asocian preferentemente con otros factores de riesgo, congénito o adquirido que puedan estar presentes en la población incluida en el estudio.

Capítulo II

Fundamentos teóricos

2.1 Hemostasia

La hemostasia normal requiere un delicado balance entre los sistemas procoagulantes y anticoagulantes naturales. Ambos sistemas están sujetos a disrupción por defectos (intrínsecos o ambientales) ya sean heredados o adquiridos¹². Cualquier alteración o lesión en la pared de los vasos sanguíneos genera la activación de los procesos de coagulación en los que intervienen diversas vías y factores con el fin de mantener la hemostasia y evitar la hemorragia; este proceso ocurre en tres pasos básicos que son: la vasoconstricción local, la agregación plaquetaria y la formación del coágulo¹⁸.

2.2 Cascada de coagulación

El modelo de cascada fue propuesto en la década de los sesenta. Este modelo describe que los factores de coagulación se convierten de manera secuencial de proenzimas a enzimas activas, proporcionándole al proceso un carácter autocatalítico de manera limitada. Posteriormente se comprobó que algunos procoagulantes son en realidad cofactores y no poseen actividad enzimática¹⁹. La coagulación es descrita por dos vías diferentes: la vía intrínseca y la vía extrínseca (Figura 1).

2.3 Tríada de Virchow

En el siglo XIX Virchow definió tres mecanismos que contribuyen a la trombosis: daño endotelial, estasis e hipercoagulabilidad, siendo los dos últimos los que predominan en la fisiopatología de la TVP. La hipercoagulabilidad puede ser heredada o adquirida (Anexo 1), pero ambas frecuentemente interactúan, por lo cual puede ser difícil definir una única causa²⁰.

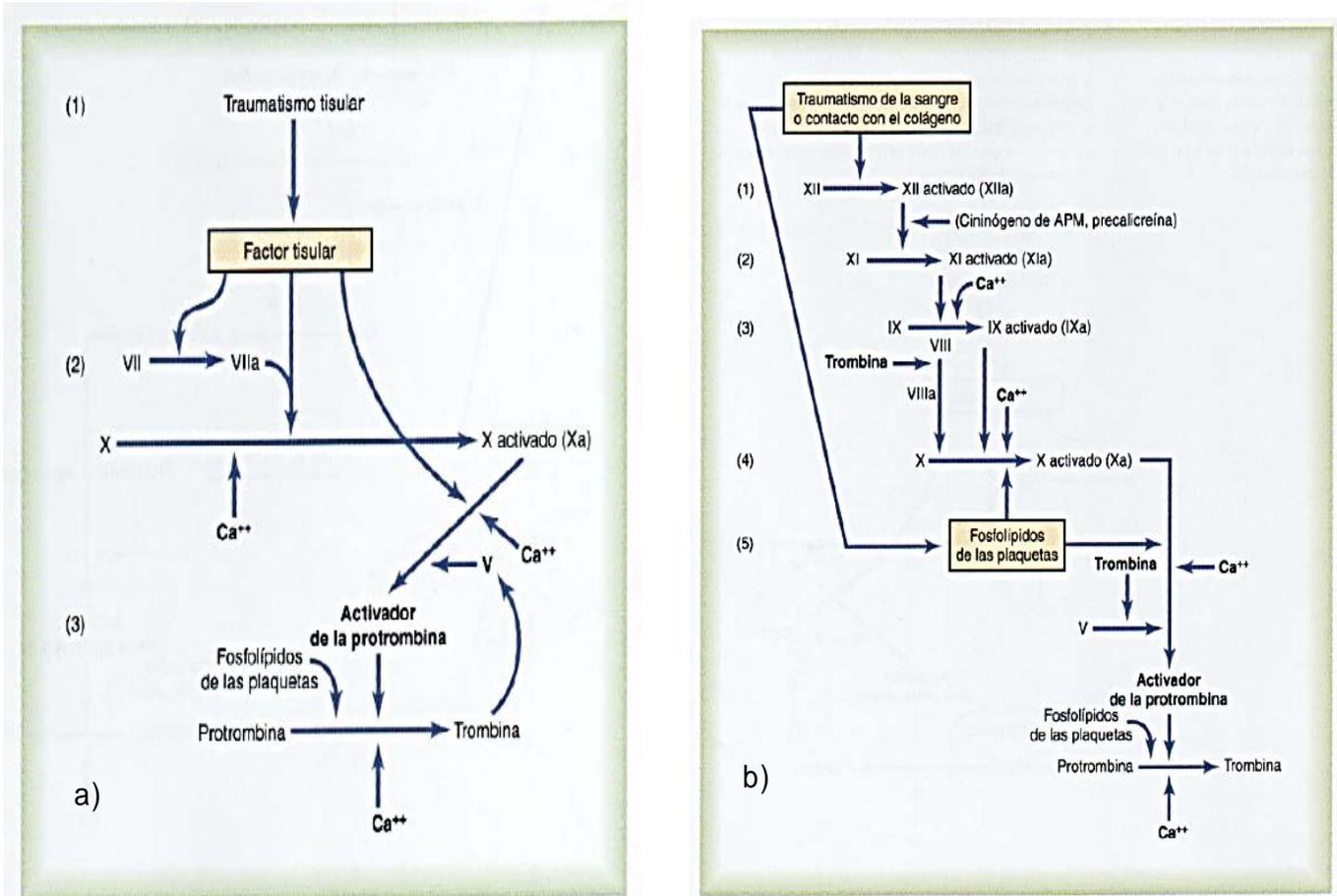


Figura 1. Esquemas de a) vía extrínseca y b) vía intrínseca de la cascada de coagulación. Tomado de Guyton A, Hall J. *Tratado de Fisiología Médica. Decimoprimer edición. McGraw Hill, México 2004.*

2.4 Estados de Hipercoagulabilidad

La trombofilia es definida como un estado de hipercoagulabilidad que lleva a una tendencia a la formación de trombos. Las alteraciones trombofílicas pueden estar condicionadas por factores intrínsecos, es decir, mutaciones en el material genético codificante de cualquier segmento del mecanismo proteico que mantiene el delicado equilibrio de la coagulación (trombofilias congénitas), generalmente favoreciendo un estado procoagulante al existir deficiencias en factores anticoagulantes como la proteína C, la proteína S o la antitrombina, alteraciones en la funcionalidad de proteínas como el Factor V o la protrombina (Factor II), resistencia al mecanismo anticoagulante de la proteína C activada, y otras menos

conocidas^{21,22}. La frecuencia de algunas de las condiciones genéticas anteriores se muestra en el Cuadro 1.

| Anormalidad trombofílica | Prevalencia en la población general | Prevalencia en pacientes con TEV | Riesgo relativo de TEV |
|-----------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| Deficiencia de antitrombina | 0.02-0.17 | 1.1 | 50 |
| Deficiencia de proteína C | 0.14-0.5 | 3.2 | 15 |
| Deficiencia de proteína S | ? | 2.2 | 6-10 |
| Factor V Leiden | 2-10 | 20-50 | 7 |
| Protrombina G20210A | 1-4 | 6-18 | 3-4 |

Cuadro 1. Trombofilias congénitas y sus prevalencias en la población general y en pacientes con manifestaciones tromboembólicas. TEV: Tromboembolismo venoso. Tomado de *Martinelli I, Passamonti SM, Bucciarelli P. Thrombophilic states. Handb Clin Neurol. 2014;120:1061-71*

También predisponen a la formación anormal de coágulos las trombofilias adquiridas debidas a factores exógenos como cirugías, encamamiento prolongado, terapia de reemplazo estrogénico, embarazo, apareamiento de anticuerpos antifosfolípidos, síndrome paraneoplásico, obesidad, entre otros²².

2.5 Mutaciones Asociadas a Hipercoagulabilidad

Factor V Leiden

Factor V Leiden es el nombre específico del resultado de una mutación en el gen F5, el cual codifica para el Factor V de la cascada de coagulación, también conocido como proacelerina²³. El Factor V Leiden es el factor de riesgo heredado más común para trombosis, el cual resulta de una sustitución de bases en la posición 1691 de dicho gen²⁴. Se trata de una mutación de sentido equivocado que cambia una región de la proteína, porque causa el reemplazo del aminoácido arginina por el aminoácido glutamina en la posición 506¹⁹. Debido a que la posición 506 es uno de los sitios donde la proteína C activada produce escisión del factor V de la coagulación, su modificación imposibilita la unión y acción

de esta proteína. Lo anterior resulta en una inactivación más lenta de dicho factor y una mayor generación de trombina, intensificándose con ello la potencial formación de coágulos.

Epidemiología

El Factor V Leiden fue descubierto en 1994¹⁹, y desde entonces se ha buscado la prevalencia de esta mutación en distintas poblaciones. Las mayores prevalencias se han encontrado en poblaciones europeas caucásicas, observándose tan altas como de 15%-11% en la población general en Grecia y Suecia¹⁰. A nivel latinoamericano, se ha reportado una frecuencia de heterocigosidad de 5.2% en pacientes con TVP en un hospital de tercer nivel en México²⁵, y en Chile la prevalencia de heterocigosidad es de 5.4% en pacientes con TVP y de 1.3% en la población general²⁶.

Implicaciones clínicas

La trombofilia causada por el Factor V Leiden se caracteriza por una pobre respuesta anticoagulante y un riesgo aumentado de tromboembolismo venoso (TEV). La TVP es la forma más común, siendo los miembros inferiores el sitio más frecuentemente afectado²⁷. Se ha encontrado una fuerte asociación entre el Factor V Leiden y la TVP²⁸.

El riesgo de desarrollar coágulos depende de si la persona heredó de sus padres una o dos copias de la mutación Factor V Leiden. Los poseedores de una copia de la mutación (heterocigotos) presentan un incremento del riesgo de desarrollar un estado de hipercoagulabilidad entre cuatro y ocho veces mayor que el de la población general. En individuos que poseen dos copias de la mutación (homocigotos) el riesgo de hipercoagulabilidad puede aumentar hasta 80 veces más que el de la población general. Por otro lado, sólo aproximadamente el 10 por ciento de los individuos con el Factor V Leiden y sin ningún otro factor de riesgo presente van a desarrollar coágulos anormales²⁹.

Se ha demostrado además que la presencia del Factor V Leiden aumenta el riesgo de sufrir abortos. En un meta-análisis, las mujeres con abortos tempranos recurrentes tuvieron una frecuencia significativamente aumentada de esta mutación³⁰. También esta mutación ha sido asociada con preeclampsia, *abruptio placenta* y retraso de crecimiento intrauterino²⁴.

Protrombina G20210A

La mutación G20210A del gen de protrombina está localizada en la región 3'UTR, y es clasificada como un factor de riesgo moderado para trombosis. En este sitio, el pre-mRNA típicamente presenta la escisión y poliadenilación bajo procesamiento endonucleolítico. Como resultado de la mutación, el gen está sobre expresado, encontrándose aumentado el RNA mensajero en el citoplasma, con un consecuente incremento de los niveles de protrombina en el plasma. Es por ello que se ha clasificado como una mutación de ganancia de función³¹.

Epidemiología

La presencia de esta mutación varía dependiendo de la localización geográfica. En los Estados Unidos se ha calculado que la mutación PT G20210A está presente en heterocigosis en aproximadamente un 2% de la población caucásica general. Esto es poco común en afroamericanos (0.5%) y raro en asiáticos, africanos y nativo americanos. En cuanto a su ocurrencia en homocigosis, es de 1 en 10,000 individuos³². En el estudio de Palomo et. al., la prevalencia en heterocigosis de la mutación Protrombina-G20210A fue 5,4% y 2,5% en los pacientes y grupo control, respectivamente. En el mismo estudio no fue reportado ningún caso de homocigosis para esta mutación²⁶.

Implicaciones clínicas

En un paciente heterocigoto para esta mutación, el riesgo de sufrir TVP aumenta de 2 a 3 veces en comparación con la población general. Además, se ha reportado que esta mutación

en homocigosis se asocia a un riesgo aún mayor, pero no se ha estimado exactamente en cuánto se incrementa³².

Específicamente en mujeres, se ha encontrado una asociación entre esta mutación y el riesgo de sufrir infarto de miocardio a temprana edad, también se ha observado que el uso de anticonceptivos orales por estas pacientes aumenta 16 veces el riesgo de sufrir de TVP. En mujeres embarazadas el riesgo de TVP se ha observado aumentado hasta 6 semanas posteriores al parto, e incluso se ha asociado a *abruptio placenta*, preeclampsia y retraso del crecimiento intrauterino³³.

2.6 Diagnóstico genético

No existen síntomas clínicos específicos que permitan detectar confiablemente la presencia de las mutaciones descritas en el presente trabajo, por lo que ante la sospecha del diagnóstico debe realizarse un análisis de ADN de los genes que codifican las proteínas afectadas. El análisis de las mutaciones se puede realizar por una variedad de métodos comparables utilizando ADN genómico en las células sanguíneas mononucleares periféricas¹⁰. Actualmente, el costo de los test genéticos es mayor a los estudios de laboratorio convencionales, pero se justifica debido a su alta sensibilidad y especificidad³. Estas pruebas además son confiables en individuos anticoagulados con heparina o warfarina y durante episodios trombóticos agudos¹⁰.

En este trabajo se utiliza una combinación de las técnicas reacción en cadena de la polimerasa e hibridación reversa de ácidos nucleicos, las cuales se detallan a continuación.

2.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica de laboratorio usada para hacer múltiples copias de un segmento de ADN. La PCR es muy precisa, y puede ser usada para amplificar un segmento específico de ADN de una mezcla de moléculas de este tipo. Primero, dos secuencias cortas de ADN

llamadas cebadoras se diseñan para unirse al principio y al final de la secuencia. Luego se agrega la muestra de ADN en donde se espera encontrar el segmento de interés, junto con una mezcla de nucleótidos libres y la enzima ADN polimerasa. Esta mezcla de reactivos se coloca en una termocicladora en donde la temperatura se aumenta y disminuye en pasos programados y automáticos.

El ciclo de amplificación está compuesto por las siguientes fases:

1. **Fase de desnaturalización:** Inicialmente la mezcla se calienta para desnaturalizar, o separar, la muestra de ADN de doble cadena en cadenas únicas.
2. **Fase de alineamiento o unión del cebador.** La mezcla luego se enfría para que los cebadores se unan al ADN (específicamente a su secuencia complementaria).
3. **Fase de elongación.** En este momento, la DNA polimerasa empieza a sintetizar nuevas cadenas de ADN, comenzando por los cebadores y añadiendo nucleótidos complementarios a la cadena molde.

La PCR luego continúa con ciclos adicionales que repiten los previamente mencionados.

El ADN recién sintetizado sirve como muestra en ciclos posteriores, lo que permite al segmento de ADN de interés ser amplificado exponencialmente millones de veces (Figura 2)³⁴.

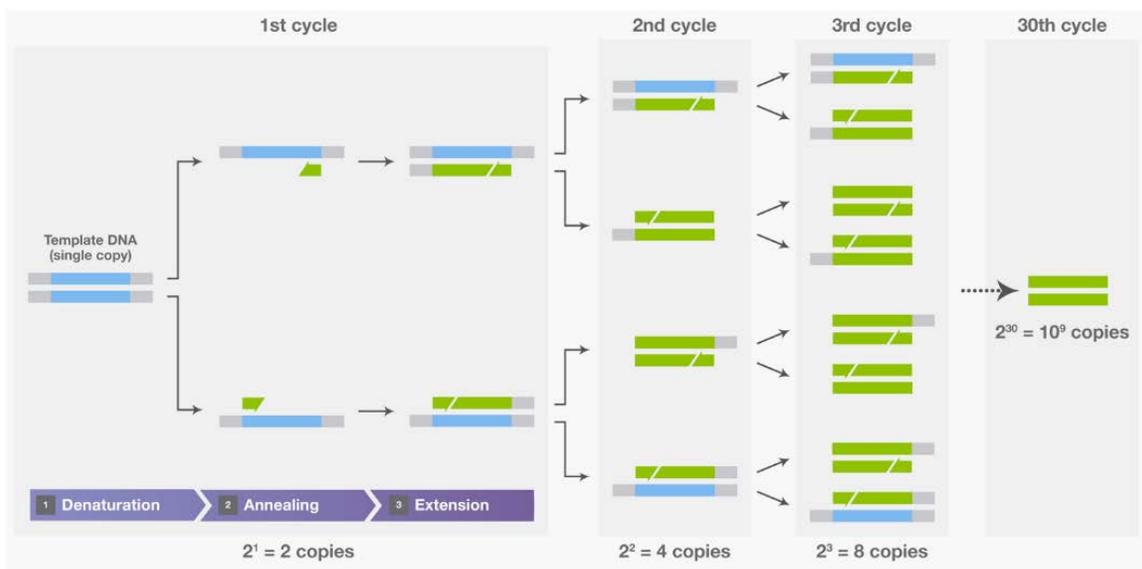


Figura 2. Reacción en cadena de la polimerasa. Tomado de: What is PCR? A Molecular Biology Lesson | American Council on Science and Health [Internet]. [citado 11 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://www.acsh.org/news/2016/10/11/what-pcr-molecular-biology-lesson-10267>

2.6.2 Hibridación reversa con sondas de ADN

Una vez que el gen de interés se encuentra amplificado, es posible hibridarlo con sondas de ADN específicas que se encuentran en una tira reactiva, y que permitirán identificar si se trata de la secuencia de un gen mutado o de su variante normal (*wild type*).

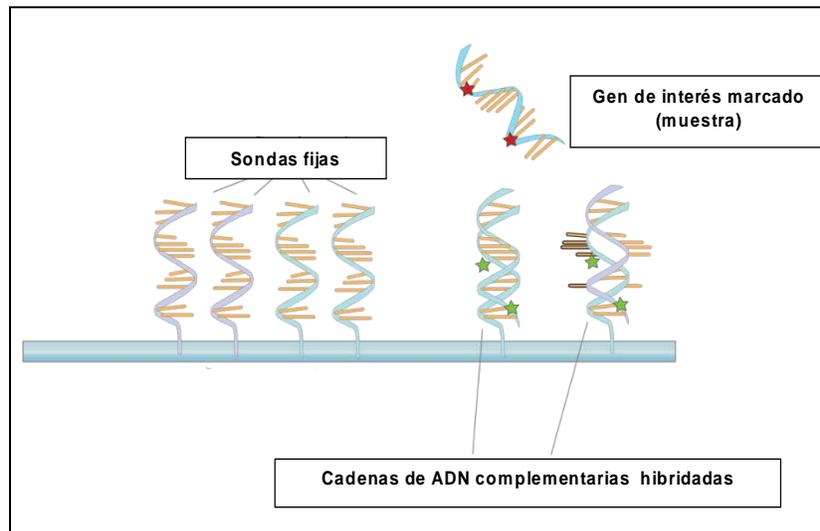


Figura 3. Sondas de ADN hibridando ADN complementario. Tomado de: DNA Testing: An Introduction for Non-Scientists [Internet]. [citado 11 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://www.scientific.org/tutorials/articles/riley/riley.html>

2.9 Importancia del Diagnóstico Genético

A pesar de que existen factores de riesgo no modificables para el desarrollo de TVP, tales como la edad y las condiciones genéticas, el conocimiento de la presencia de mutaciones que predisponen a la formación de coágulos puede permitir que se traten de disminuir los factores de riesgo modificables tales como la obesidad, el uso de anticonceptivos orales, la terapia de reemplazo hormonal y el tabaquismo, entre otros. Esto a su vez supondría un impacto positivo en los costos que implica el tratamiento de la TVP. Además, en situaciones de alto riesgo de trombosis (encamamiento prolongado, cirugías ortopédicas, viajes de larga

duración, embarazo, etc.) se justificaría el uso profiláctico de anticoagulantes según las características de cada paciente³⁵.

2.10 Evaluación Clínica

La Clasificación CEAP (según sus siglas en inglés para *manifestaciones clínicas* (C), *factores etiológicos* (E), *distribución anatómica* (A) y *hallazgos fisiopatológicos subyacentes* (P)) para trastornos venosos crónicos fue creada en 1994 por un Comité Internacional ad hoc del Foro Venoso Americano, avalado por la Sociedad de Cirugía Vasculat. Diez años después se realizó una revisión y actualización, generando nuevas recomendaciones para el año 2004. Esta clasificación surge debido a la falta de claridad de criterios diagnósticos de los desórdenes venosos crónicos y la necesidad de estandarización tanto en estudios clínicos como en medidas terapéuticas³⁶.

CEAP es una clasificación dinámica, esto significa que se necesitan evaluaciones seriadas del paciente para re clasificar la patología en distintos puntos en el tiempo, iniciando en la primera visita del paciente a la consulta.

| CLASIFICACIÓN CLÍNICA | | CLASIFICACIÓN ETIOLÓGICA | |
|-----------------------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| C ₀ | No signos visibles o palpables de enfermedad venosa | Ec | Congénita |
| C ₁ | Telangiectasias o venas reticulares | Ep | Primaria |
| C ₂ | Venas varicosas | Es | Secundaria (post trombótica) |
| C ₃ | Edema | CLASIFICACIÓN ANATÓMICA | |
| C _{4a} | Pigmentación o eczema | As | Venas superficiales |
| C _{4b} | Lipodermatoesclerosis o atrofia blanca | Ap | Venas perforantes |
| C ₅ | Úlcera venosa cicatrizada | Ad | Venas profundas |
| C ₆ | Úlcera venosa activa | An | Sin localización venosa identificada |
| S | Sintomático | CLASIFICACIÓN FISIOPATOLÓGICA | |
| A | Asintomático | Pr | Reflujo |
| | | Po | Obstrucción |
| | | Pr-o | Reflujo y Obstrucción |

Cuadro 2. Clasificación CEAP. Tomado de: Vásquez MA et. al. *Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. J Vasc Surg. 2004 Dec;40(6):1248-52.*

Capítulo III

Operacionalización de Variables

| Variable | Descripción | Operacionalización | Categorías | Nombre de Categoría |
|---|--|---|--|------------------------|
| Edad (Cuantitativa) | Tiempo que ha ocurrido desde el nacimiento de un ser vivo | Número de años cumplidos verificado con el Documento Único de Identidad (DUI) | Edad en números | Edad |
| Sexo (Cualitativa dicotómica) | Condición orgánica por nacimiento. Masculino o femenino. | Sexo según DUI | Femenino Masculino | Sexo |
| Talla (Cuantitativa) | Estatura o altura de las personas | Medición a través de tallímetro | Cantidad en metros | Talla |
| Peso (Cuantitativa) | Medida que determina la fuerza con que la tierra atrae a un cuerpo. | Medición a través de báscula | Cantidad en kilogramos | Peso |
| Área geográfica (Cualitativa dicotómica) | Espacio geográfico del que proviene un individuo que se distingue por caracteres geográficos, botánicos, zoológicos, económicos, etc. | Dirección según DUI | Rural Urbano | Área geográfica |
| Grado de escolaridad (Cualitativa ordinal) | Conjunto de cursos que un estudiante sigue en un establecimiento docente | Referido por paciente durante entrevista médica | Ninguna Primaria Secundaria Bachillerato Universitario | GE |
| <i>Wild type</i> (Cualitativa dicotómica) | Genotipo más frecuente observado en la naturaleza o designado arbitrariamente como "normal" | Genotipo designado como normal por la tira del kit ThromboType | Sí No | <i>Wild type</i> (G/G) |
| Homocigosidad (Cualitativa dicotómica) | Individuo que posee los alelos correspondientes a un carácter iguales. | Resultados positivos a mutación en ambos alelos para cada gen estudiado por medio de la tira reactiva ThromboType. | Sí No | Homocigoto (A/A) |
| Heterocigosidad (Cualitativa dicotómica) | Individuo que posee alelos diferentes para un mismo carácter. | Resultados positivos a mutación en un alelo para cada gen estudiado por medio de la tira reactiva ThromboType. | Sí No | Heterocigoto (G/A) |
| Índice de Masa Corporal (Cuantitativa y Cualitativa categórica) | Situación en la que se encuentra una persona en relación con la ingesta y adaptaciones fisiológicas que tiene lugar tras la ingesta de nutrientes. | Calculo de Índice de Masa Corporal (IMC) adultos: Kilogramos / metro ² . Bajo Peso: menos de 18.5 Normal 18.5-24.9 Sobrepeso 25-29.9 Obesidad ≥ 30 | Bajo Peso Normal Sobrepeso Obesidad | IMC |
| Trombosis | | | Sí | TVP |

| | | | | |
|--|---|--|--|-----------------------|
| Venosa Profunda (Cualitativa dicotómica) | Patología definida por la presencia de uno o varios trombos dentro del sistema venoso profundo | Detección por medio de Doppler venoso, dímero D, venografía, TAC o RMN | No | |
| Antecedentes personales de TVP (Cuantitativa y Cualitativa categórica) | Hecho o circunstancia de TVP con diagnóstico por Doppler venoso, dímero D, venografía, TAC o RMN en el historial del paciente. | Referidas por el paciente durante la entrevista médica y expediente clínico. | Número de eventos trombóticos previos | |
| TVP recurrente | Episodio de TVP posterior a un diagnóstico inicial de la misma condición. | Referidas por el paciente durante la entrevista médica y expediente clínico. | Número de eventos trombóticos previos | |
| Antecedentes familiares de TVP (Cualitativa dicotómica) | Hecho o circunstancia de TVP con diagnóstico por Doppler venoso, dímero D, venografía, TAC o RMN en familiares de primer grado. | Referidas por el paciente durante la entrevista médica. | Si No | ATF |
| Clasificación clínica (Cuantitativa y Cualitativa categórica) | Sistema de clasificación completo para trastornos venosos crónicos el cual incluye una descripción de la clase clínica (C) con base en signos objetivos, la etiología (E), la distribución anatómica (A) del reflujo y obstrucción en las venas superficiales, profundas y perforantes, y la fisiopatología subyacente (P), ya sea que se deba a reflujo u obstrucción. | Puntaje obtenido basados en la descripción clínica (C) | C0: sin signo visible o palpable de enfermedad venosa C1: telangiectasias C2: venas varicosas (diámetro mayor o igual a 3 mm.) C3: edema C4: alteraciones cutáneas o de tejido celular C4a: pigmentación y/o edema C4b: celulitis indurada y/o atrofia blanca C5: úlcera cicatrizada C6: úlcera no cicatrizada | Clasificación clínica |
| Diabetes Mellitus (Cualitativa) | Grupo de enfermedades | Glicemia en ayunas: Normal < 100 mg/dL | Si No | DM |

| | | | | |
|--|--|---|--|--------------|
| dicotómica) | metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultado de una inadecuada secreción o acción de la insulina, o una combinación de ambas. | Alteración de la glucosa en ayunas: 100-125 mg/dL Diagnóstico provisional de DM: > 126 mg/dL | | |
| Hipertensión arterial (Cualitativa dicotómica) | Enfermedad crónica caracterizada por un incremento continuo de las cifras de presión sanguínea en las arterias. | Clasificación de la HTA. Normal: < 120 / < 80 mmHg Pre hipertensión: 129-130/80-89 mmHg HTA E-1: 140-159/90-99 mmHg HTA E-2: >160/>100 mmHg | Sí No | HTA |
| Tabaquismo (Cualitativa dicotómica) | Consumo de cigarrillos durante el último año. | Referido por paciente durante entrevista médica. | Sí No | Tab |
| Dislipidemia (Cualitativa dicotómica) | Alteraciones de los niveles séricos de las lipoproteínas y de sus lípidos y/o de la presencia de depósitos de ellos en la piel y tendones. | Referido por paciente durante entrevista médica y revisión de expediente clínico, al cumplir una o más de las siguientes variables: Colesterol total mayor de 200 mg/dL, Triglicéridos mayor de 150 mg/dL. Colesterol LDL mayor de 130 mg/dL. | Sí No | Dislipidemia |
| Sitio de trombosis (Cualitativa categórica) | Vasos venosos afectados por trombosis. | Trombosis proximal: trombosis en venas ilíacas, poplítea y/o femoral. Trombosis distal: localizada debajo de la rodilla y confinada a las venas tibial anterior y posterior, peroneal y venas musculares. Localización atípica: trombosis en vasos cerebrales, mesentéricos, hepáticos, y en miembros superiores. | Miembro inferior derecho. Miembro inferior izquierdo. Ambos miembros inferiores. Trombosis en localización atípica. | ST |
| Historia de abortos previos (Cuantitativa) | Uno o más embarazos previos que terminaron con la expulsión del producto de la concepción antes de las 20 semanas de gestación. | Antecedentes obtenidos por medio de la historia clínica | Número de abortos previos | HAP |

Capítulo IV

Metodología

4.1 Tipo de Investigación

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal.

4.2 Universo, Población y Muestra

- Universo: Pacientes salvadoreños con diagnóstico de TVP.
- Población: Pacientes salvadoreños en control en clínicas privadas especializadas y con diagnóstico de TVP.
- Muestra: Pacientes salvadoreños en control en clínicas privadas y con diagnóstico de TVP, durante el período de Agosto a Noviembre de 2016.

4.3 Muestreo

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, limitado a 40 (± 10).

4.4 Criterios de Inclusión y Exclusión

Basados en la American College of Medical Genetics, se aplicaron los siguientes criterios:

Criterios de Inclusión:

- Pacientes (hombres y mujeres) con diagnóstico de TVP confirmado por Doppler venoso, venografía, resonancia magnética y/o dímero D, y que cumplan una o más de las siguientes condiciones:
 - Aparecimiento de TVP por primera vez antes de los 50 años.
 - Aparecimiento de TVP después de los 50 años de edad en ausencia de malignidad.
 - TVP en sitios inusuales (vasos cerebrales, mesentéricos o hepáticos).
 - TVP recurrente.

- TVP en mujeres que toman anticonceptivos orales o que estén bajo terapia de reemplazo hormonal.
- Pacientes en control en clínicas privadas especializadas con diagnóstico de TVP
- Edad mayor de 18 años y que otorguen su consentimiento informado.

Criterios de Exclusión:

- Pacientes embarazadas o en período puerperal con diagnóstico de TVP.
- Pacientes con diagnóstico de trombosis arterial.
- Paciente que solicite su retiro del estudio durante la realización del mismo.

4.5 Materiales y métodos

El estudio se desarrolló en cuatro fases:

Primera fase: Contacto con centros especializados en trastornos venosos crónicos.

Se contactaron cinco directores de centros especializados en trastornos venosos crónicos del país, de los cuales cuatro accedieron a realizar una reunión informativa sobre el estudio. Finalmente, tres centros participaron brindando acceso a expedientes de pacientes para poder contactarlos por vía telefónica.

Segunda fase: Contacto con pacientes con diagnóstico confirmado de TVP.

Se contactaron a 57 pacientes con diagnóstico confirmado de TVP, de los cuales 38 accedieron a participar en el estudio. Durante esta fase se citó a los sujetos en 6 jornadas sabatinas, en su respectivo centro privado, con los siguientes objetivos:

- 1- Brindar charla informativa sobre el estudio, incluyendo epidemiología de las mutaciones, importancia, objetivos, criterios de inclusión y posibles riesgos asociados.
- 2- Dar lectura y obtener firma del consentimiento informado (Anexo 2).

- 3- Registrar la información del paciente mediante el uso de una ficha clínica (Anexo 3).
Además, se llevó a cabo la revisión de expedientes para complementar la información necesaria para el análisis del impacto clínico que podrían generar las mutaciones investigadas.
- 4- Tomar medidas antropométricas.
- 5- Verificación del estadio clínico del paciente según la clasificación CEAP.
- 6- Recolectar muestras de sangre venosa periférica por personal capacitado (Anestesista).

Cada muestra se etiquetó inmediatamente de ser colectada con un código correlativo para cada paciente y se depositó en un contenedor como medida de bioseguridad y para evitar su contaminación. Para asegurar la cadena de frío, las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta su traslado al Laboratorio de Biología Molecular en la Universidad Dr. José Matías Delgado, donde se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

Tercera fase: Procesamiento de muestras.

Procesamiento de muestras en el Laboratorio de Biología Molecular en la Universidad Dr. José Matías Delgado.

a) Recolección de muestras y aislamiento de ADN.

Se recolectaron aproximadamente 5 mL de sangre venosa periférica de cada paciente en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) la cual fue almacenada a -20°C hasta la extracción del material genético. Se realizó el aislamiento del ácido desoxirribonucleico (ADN) utilizando 200 μL de muestra para su procesamiento con el kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Alemania) (Anexo 4). Se verificó la presencia del material genético aislado por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Anexo 5, figura 1 y 2), teñido con GelRed y visualizado con luz ultravioleta. El material genético extraído fue

almacenado a una temperatura de -20°C hasta la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

b) Reacción en cadena de la polimerasa (PRC)

La detección de las variantes genéticas se realizó utilizando el kit ThromboType® (Hain Lifescience, Alemania). Se amplificó el material genético de interés según el siguiente protocolo especificado en el kit: Ciclo de desnaturalización inicial por 15 minutos a 95°C, posteriormente una fase de alineamiento de cebador de 10 ciclos de 95°C por 30 segundos y 58°C por 2 minutos, luego una fase de extensión de 20 ciclos de 95°C por 25 segundos, 53°C por 40 segundos y 70°C por 40 segundos. Finalmente, se realizó una fase de elongación a 70°C por 8 minutos. Se verificó la presencia de amplicones por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Anexo 5, Figura 3 y 4).

c) Reacción de hibridación reversa.

Posteriormente los productos de amplificación de cada muestra se hicieron hibridar sobre tiras que contenían oligonucleótidos específicos para cada variante génica. Debido a que los primers contienen biotina, es posible su unión a la estreptavidina que está conjugada con fosfatasa alcalina. Finalmente, se añade un sustrato para la enzima que se convierte en un producto coloreado, se cumplió de forma estricta con el protocolo descrito en el kit (Anexo 6,7).

d) Controles utilizados en los diferentes procedimientos

Se incluyó un control negativo (agua estéril) en cada jornada de extracción de ADN. Con cada grupo de extracciones se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para verificar la presencia de material genético. Ningún control negativo mostró presencia de ADN en el gel. En cada PCR se incluyó el control negativo de la extracción de ADN correspondiente, y un control negativo propio de la PCR (agua estéril) para confirmar la

ausencia de contaminación de los reactivos. Además se incluyó un control positivo de ADN humano con la variante *wild type* de los genes en estudio. Cada tira reactiva para la hibridación reversa contenía un control de sensibilidad y un control de especificidad para cada gen estudiado que aseguraban que la reacción de hibridación se había llevado a cabo en condiciones óptimas y que el resultado era confiable.

Se utilizó un total de 44 tiras reactivas. Cada tira procesada fue registrada y almacenada en la hoja de recolección de resultados para cada paciente, (Anexo 8).

Cuarta fase: Análisis de los resultados y entrega a los médicos especialistas de las clínicas privadas.

Plan de procesamiento y análisis de resultados

Todos los datos fueron consignados en una ficha por paciente y posteriormente tabulados en una base de datos de Microsoft Excel. Los arreglos posteriores fueron realizados en GraphPad Prism 6.0. La información obtenida fue sometida a estadística descriptiva y a un test exploratorio de D'Agostino-Pearson para la determinación del tratamiento estadístico (paramétrico-no paramétrico) mediante la utilización de comparación de grupos (t-test no pareados).

4.7 Consideraciones éticas

El presente estudio se realizó bajo los principios éticos plasmados y establecidos en la Declaración de Helsinki, el Código de Núremberg, el Convenio de Belmont y las Pautas éticas CIOMS. Se solicitó el permiso correspondiente al Departamento de Investigación y Docencia en Salud del Instituto Salvadoreño del Seguro Social para revisión metodológica. Además, esta investigación estuvo sujeta a la revisión y escrutinio del Comité de Ética de Investigación del Instituto Salvadoreño del Seguro Social, quien dio su aprobación y

recomendaciones para la ejecución de la misma (Anexo 9). Con lo cual se solicitó la autorización a cada clínica privada para realizar las pruebas genéticas a los pacientes que cumplían con los criterios de inclusión. Cada sujeto se sometió de manera voluntaria a la realización de este estudio con previa aceptación de lo estipulado en el consentimiento informado que se dio por escrito. Así mismo, se guardó la confidencialidad de los pacientes seleccionados identificando las muestras con códigos y salvaguardando toda la información de forma que solo tuviese acceso a ella el equipo que ha desarrollado el trabajo de investigación.

Se le tomó una muestra de sangre venosa periférica a cada paciente, se les informó sobre los posibles riesgos tales como: vasculitis, eritema, edema y dolor en el área de punción.

A todos los sujetos se les realizó un test genético en búsqueda de las mutaciones en estudio extrayendo el ADN de la muestra de sangre. Tanto las muestras de sangre como las extracciones de ADN no fueron empleadas para otro fin y serán descartadas tras la presentación de los resultados de este trabajo de tesis.

Finalmente, los resultados de dicho test se le hicieron llegar al médico correspondiente para ser comunicados a aquellos sujetos que desearan conocerlos.

Capítulo V

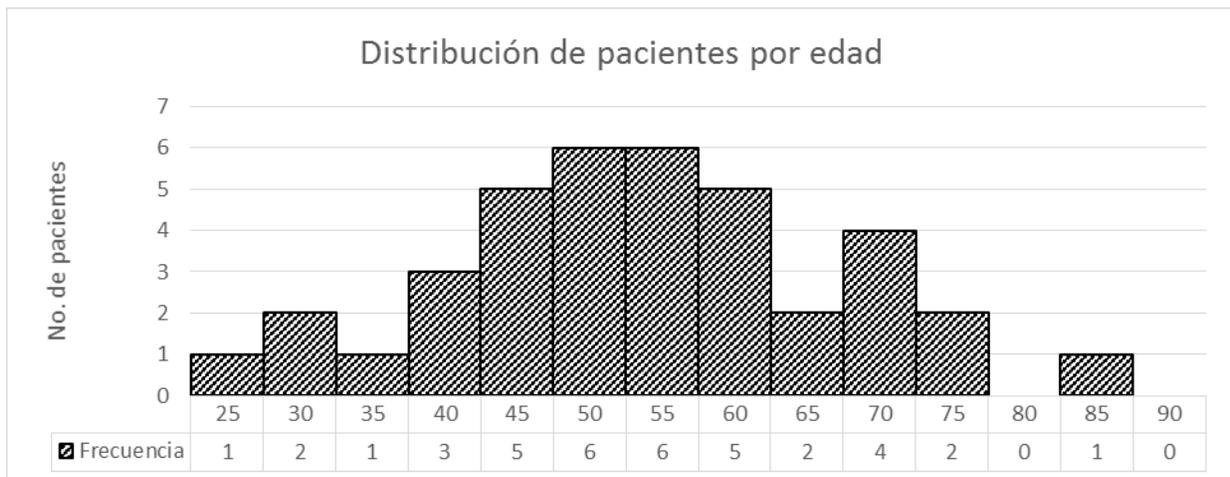
Resultados

5.1 Caracterización demográfica de la población con trombosis venosa profunda.

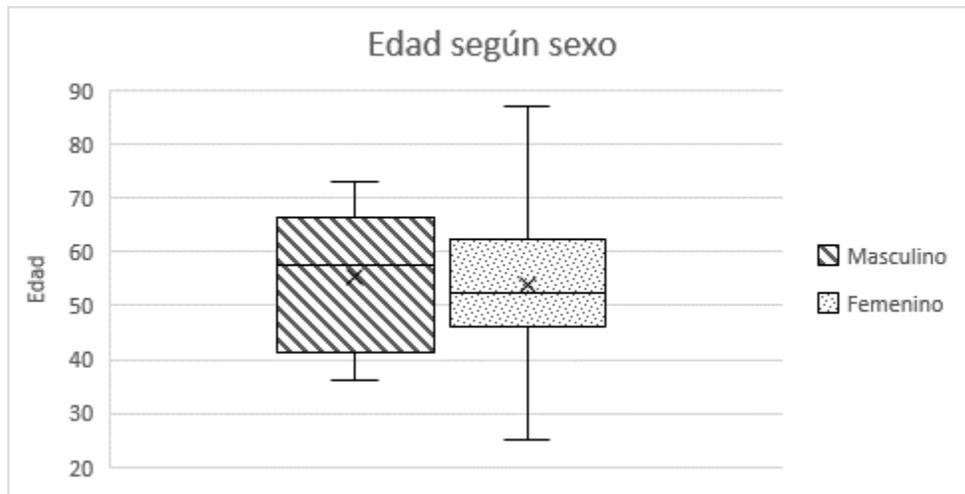
Edad y sexo.

Un total de 38 pacientes cumplieron los criterios de inclusión del estudio de los cuales el 21% pertenecen al sexo masculino (n=8), mientras que el 79% son mujeres (n=30), teniendo una relación de 1:3.7.

La edad promedio general fue de 54.24 ± 2.17 años (I.C. 95%), con una desviación estándar de 13.4 años, una mediana de 53 años y una moda de 56 años. La agrupación de los datos por edad sugiere una distribución normal de la población (Prueba d'Agostino-Pearson $P=0.9017$) (Gráfica 1). No existe diferencia estadísticamente significativa entre el promedio de edad entre hombres y mujeres (t test no pareado $P=0.791$) (Gráfica 2).



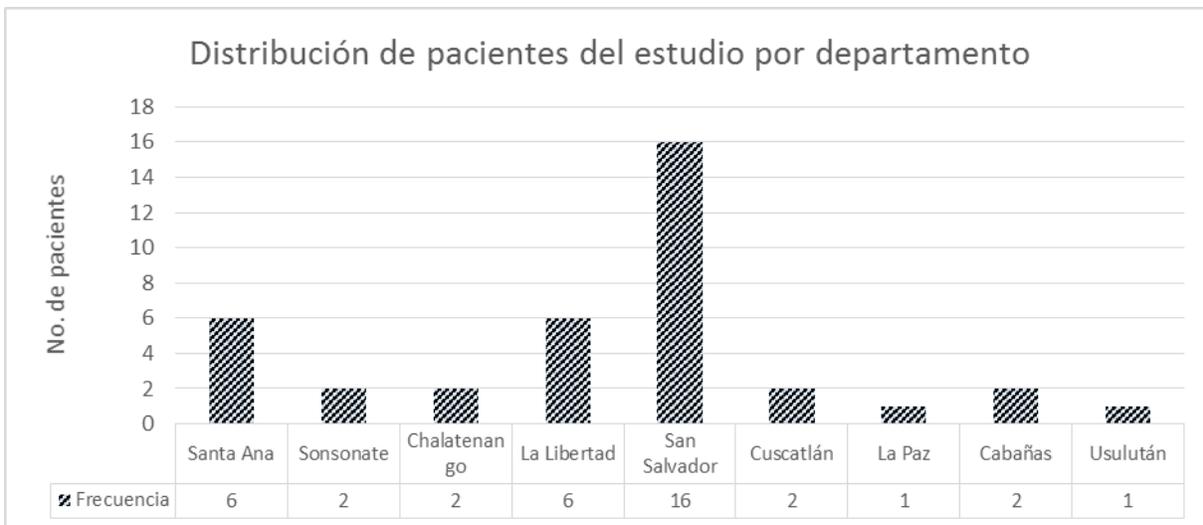
Gráfica 1. Histograma de distribución de pacientes por rangos de edad.



Gráfica 2. Gráfico de cajas y bigotes de pacientes según sexo y edad.

Procedencia geográfica.

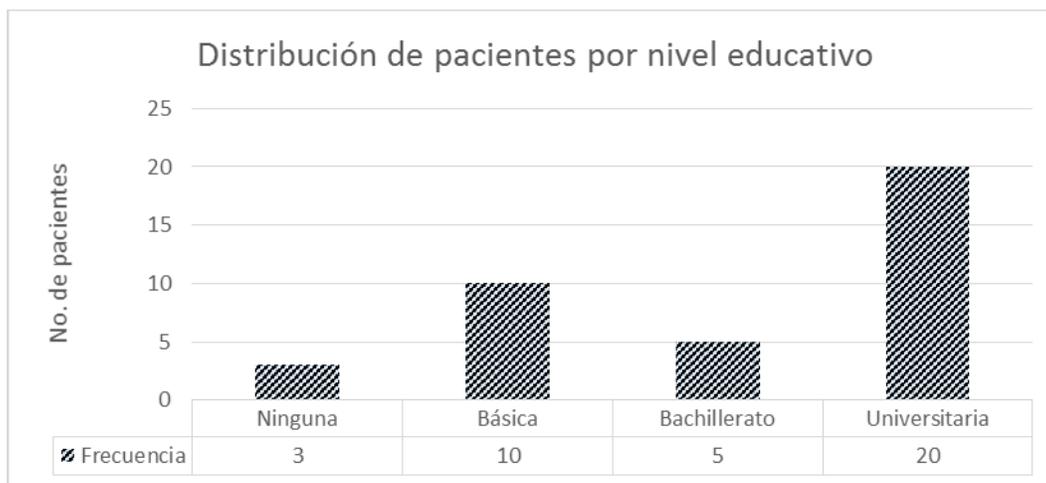
Se obtuvo representación de pacientes de 9 de los 14 departamentos de El Salvador, con el mayor número proveniente de los departamentos de San Salvador (42%, n=16), La Libertad (16%, n=6) y Santa Ana (16%, n=6), en orden descendente. El resto de pacientes provenían de Sonsonate (5%, n=2), Chalatenango (5%, n=2), Cuscatlán (5%, n=2), Cabañas (5%, n=2), La Paz (3%, n=1) y Usulután (3%, n=1) (Gráfica 3). Un total de 33 pacientes (87%) eran del área urbana y 5 pacientes del área rural (13%).



Gráfica 3. Distribución de pacientes según departamento de procedencia.

Nivel Educativo

Un 53% de los pacientes (n=20) manifestó poseer una educación universitaria, un 26% (n=10) cumplieron solo educación básica y un 13% (n=5) tenían título de bachillerato. El 8% de los pacientes (n=3) expresó no haber recibido ninguna educación formal (Gráfica 4).



Gráfica 4. Distribución de pacientes según nivel educativo.

5.2 Frecuencia relativa de variantes de los genes codificantes para el Factor V y la Protrombina en la población estudiada.

De los 38 pacientes a los que se le realizó el test genético, el 100% presentó la variante *wild type* para los genes codificantes del Factor V y Protrombina. No se encontraron las variantes mutadas en heterocigosidad ni homocigosidad (Cuadro 3).

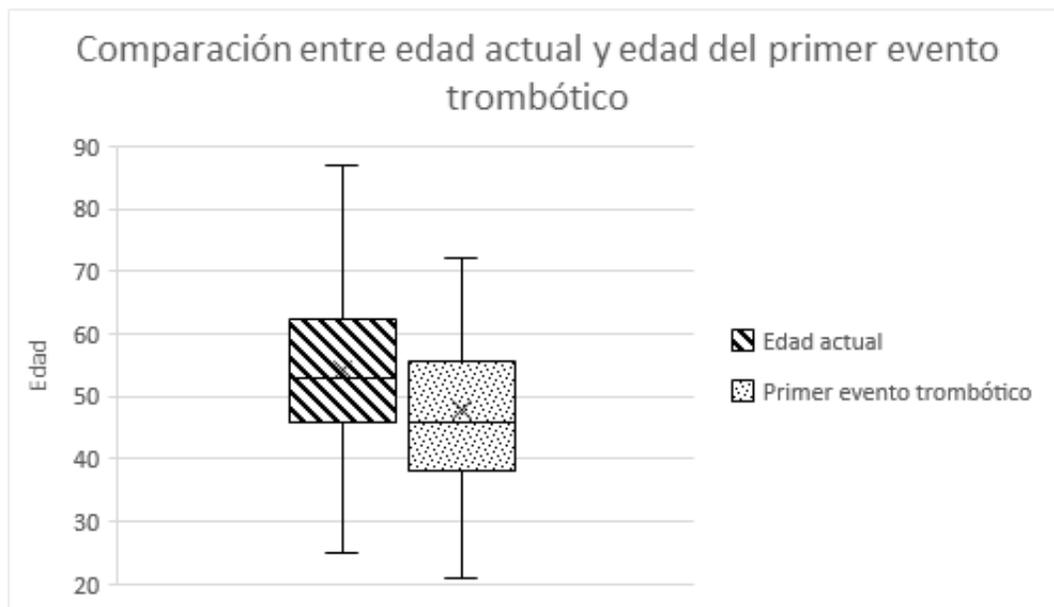
| Factor V | Pacientes con Trombosis Venosa Profunda | |
|-----------------------|---|-------|
| | N | % |
| Wild Type (G/G) | 38 | 100.0 |
| Factor V Leiden (G/A) | 0 | 0.0 |
| Factor V Leiden (A/A) | 0 | 0.0 |
| Protrombina | N | % |
| Wild Type (G/G) | 38 | 100.0 |
| G20210A (G/A) | 0 | 0.0 |
| G20210A (A/A) | 0 | 0.0 |

Cuadro 3. Frecuencia relativa de variantes genéticas en la población estudiada.

5.3 Condición clínica y relación con hallazgos genéticos

Método diagnóstico y edad de primer evento trombótico.

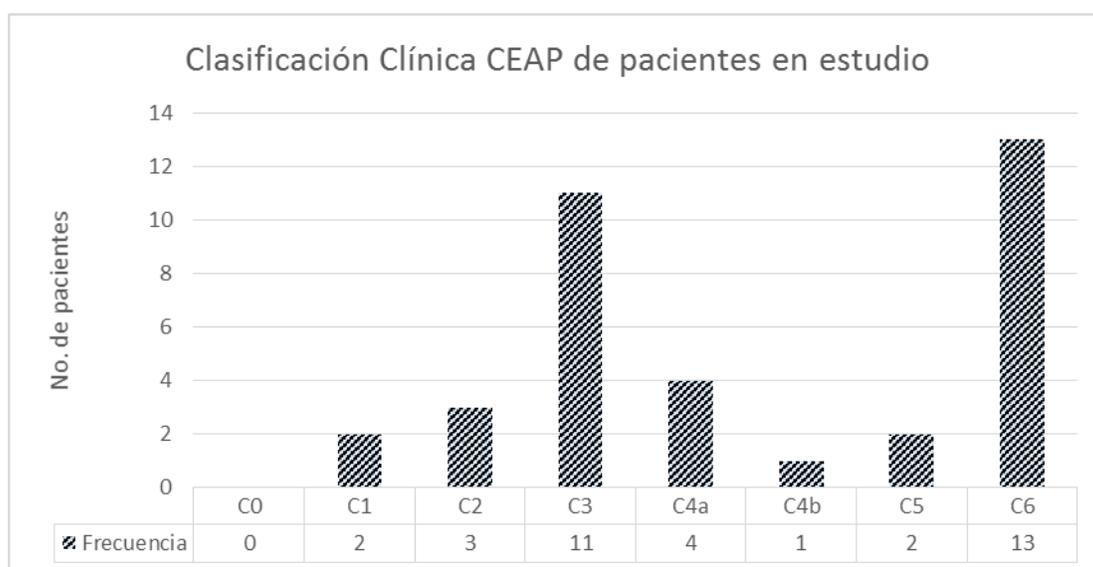
El método diagnóstico de trombosis venosa más comúnmente utilizado fue la ultrasonografía Doppler en el 84% de los pacientes (n=32). 5% de los pacientes (n=2) fueron diagnosticados mediante venografía con contraste, y en el 8% (n=3) se utilizó una combinación de métodos diagnósticos. Solo el diagnóstico de un paciente fue complementado con la determinación del dímero D. La edad promedio en la que los pacientes presentaron el primer evento trombótico fue de 46.86 años, con una desviación estándar de +/- 12.86 años (IC 95%), con una moda de 45 años y una mediana de 46 años. Existe una diferencia de medias de 6.36 años entre la edad actual de los pacientes y la edad al presentar el primer evento trombótico (Gráfica 5).



Gráfica 5. Comparación entre la edad del paciente al momento del estudio y la edad a la cual se presentó el primer evento trombótico.

Clasificación clínica de trastornos venosos crónicos

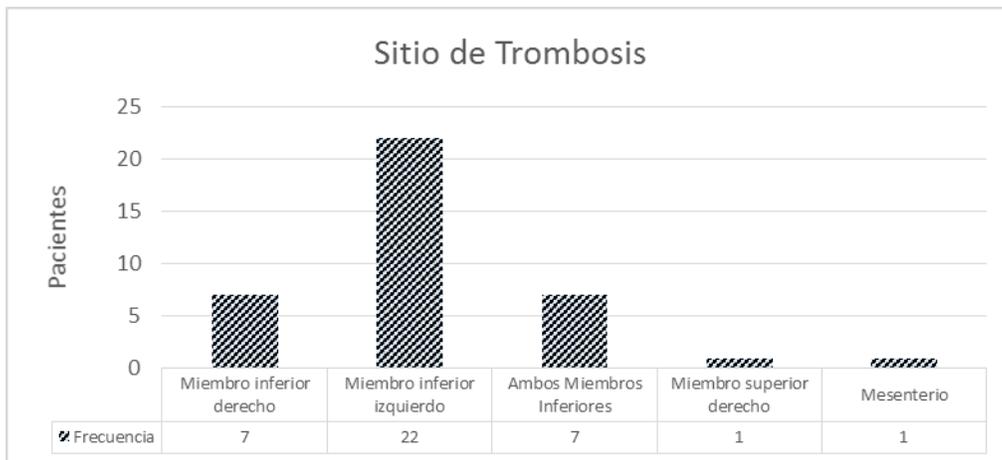
Dentro del presente estudio, se utilizó la categorización CEAP para clasificación de trastornos venosos crónicos. El 36% de pacientes se encontraba en la categoría C6 (n=13) (úlceras activas), seguidos por los pacientes en la categoría C3 (31%, n=11) (edema), pacientes de la categoría C4a (11%, n=4) (pigmentación o eczema). El resto de pacientes se encontraba en las categorías C2 (8%, n=3), C1 (6%, n=2), C5 (6%, n=2) y C4b (3%, n=1) (Gráfica 6).



Gráfica 6. Distribución de pacientes en estudio según la clasificación clínica CEAP.

Sitio de Trombosis

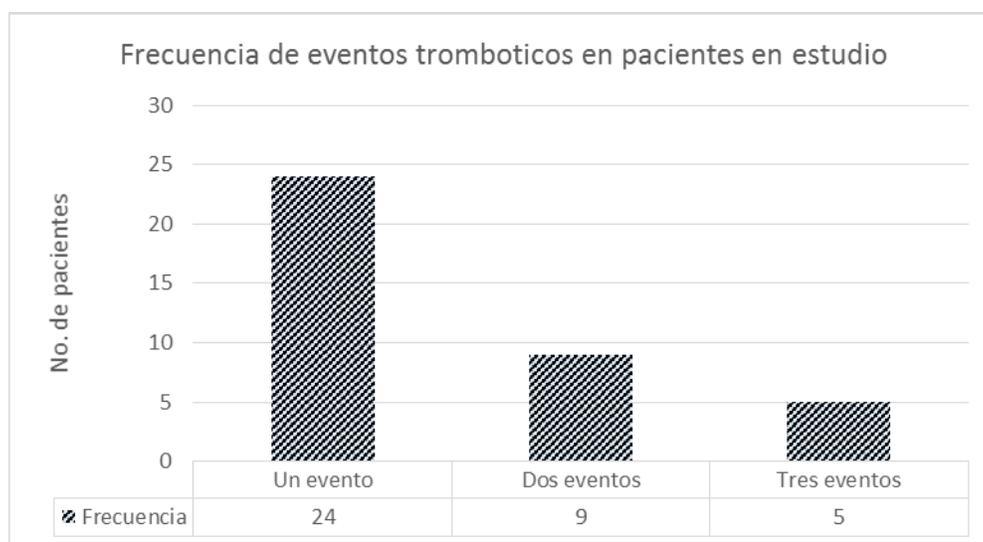
De los 38 pacientes con historia de trombosis venosa profunda, un 95% (n=36) presentó trombosis en uno o ambos miembros inferiores, siendo el miembro inferior izquierdo el más afectado (58%, n=22), seguido del miembro inferior derecho (18%, n=7), la afectación bilateral se presentó con menor frecuencia (18%, n=7). Dentro de los sitios inusuales de presentación de trombosis venosa profunda, 2.5% de los pacientes (n=1) presentaba trombosis mesentérica y el mismo porcentaje presentaba afectación del miembro superior derecho. (Gráfica 7).



Gráfica 7. Sitios de trombosis más comunes en los pacientes en estudio.

Recurrencias y manejo.

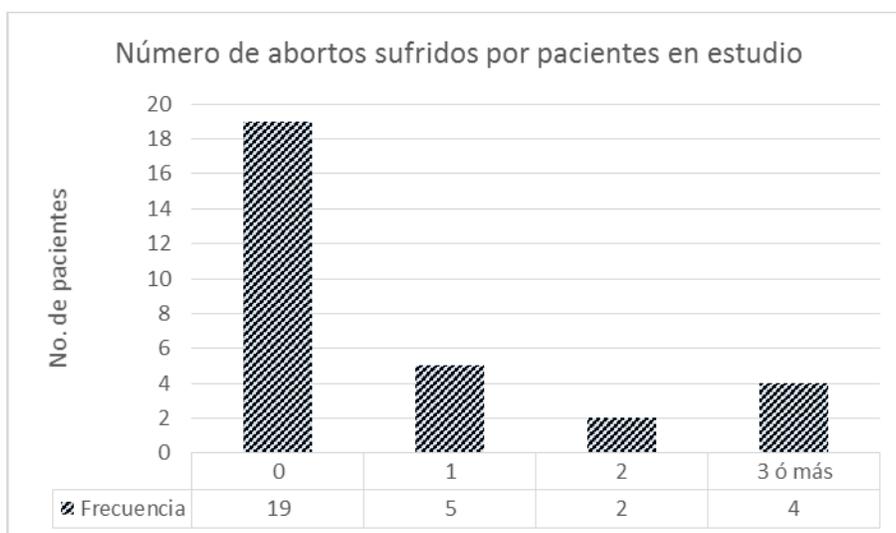
63% (n=24) de los pacientes en estudio presentaron un único episodio trombótico, 24% (n=9) presentaron dos eventos, y 13% (n=5) tuvieron tres episodios (Gráfica 8). De la serie de pacientes estudiados, 32% (n=12) fueron sometidos a tratamiento quirúrgico posterior al episodio de trombosis venosa profunda, mientras que 68% (n=26) fueron tratados con manejo médico.



Gráfica 8. Frecuencia de recurrencia de eventos trombóticos en un mismo paciente.

Antecedentes obstétricos

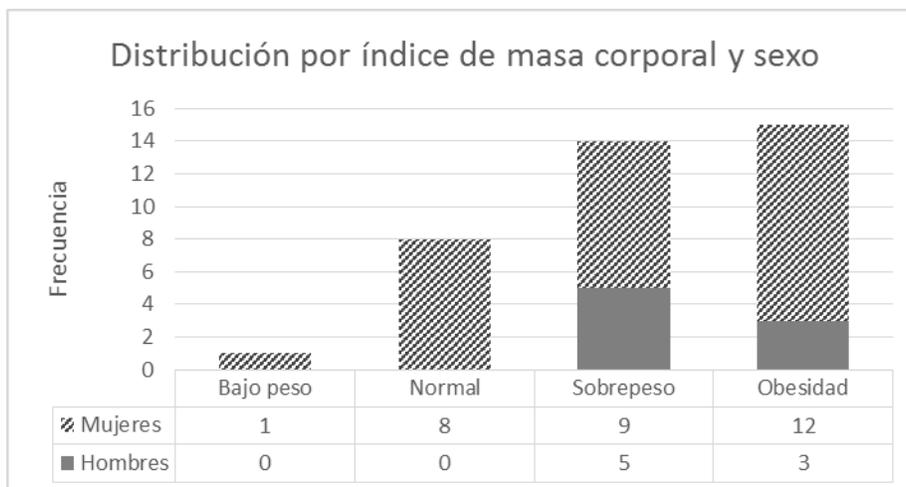
Dentro de las treinta pacientes de sexo femenino, un 63% (n=19) nunca presentaron un aborto, mientras que 17% (n=5) tuvieron un aborto, 7% (n=2) reportaron un historial de 2 abortos previos y un 13% (n=4) de las pacientes reportaron un número de 3 o más abortos, reportando un número máximo de 8 abortos. Ninguna paciente de la serie estudiada reportó antecedentes de placenta previa (Gráfica 9).



Gráfica 9. Número de abortos previos en pacientes participantes.

Estado nutricional y enfermedades crónicas concomitantes.

Se indagó acerca de la presencia de enfermedades crónicas en la población estudiada, así como la presencia de tabaquismo y una evaluación del estado nutricional a través del índice de masa corporal. Dentro de los pacientes incluidos en el estudio, 3% (n=1) se encontró con bajo peso, 21% (n=8) de los pacientes se consideraban dentro del peso normal para su talla, 37% (n=14) de los pacientes tenían sobrepeso y 39% (n=15) presentaron obesidad. De acuerdo a lo anterior, puede afirmarse que más de dos tercios de la población estudiada presentaban un peso corporal mayor del estipulado para su talla (Gráfica 10).



Gráfica 10. Distribución de pacientes según índice de masa corporal y sexo.

De la serie de pacientes seleccionados, un 89% (n=34) de los mismos refirió no fumar o no haber fumado por lo menos 10 años antes de la realización del estudio. Solamente 8% (n=3) de los pacientes tenían diagnóstico de Diabetes Mellitus al momento de la toma de la muestra, y 29% (n=11) eran hipertensos. Ningún paciente presentaba ambas comorbilidades. Un 24% (n=9) refirió presentar algún tipo de dislipidemia, mientras que el resto (76%, n=29) negó haber sido diagnosticado con esta condición (Cuadro 4). 55% (n=21) de los pacientes no presentaba ninguna de las comorbilidades mencionadas anteriormente.

| | Hombres | | Mujeres | | Total | |
|------------------------------|---------|------|---------|------|-------|------|
| | n | % | N | % | n | % |
| Tabaquismo | | | | | | |
| Sí | 1 | 2.6 | 3 | 7.9 | 4 | 10.5 |
| No | 7 | 18.4 | 27 | 71.1 | 34 | 89.5 |
| Hipertensión arterial | | | | | | |
| Sí | 3 | 7.9 | 9 | 23.7 | 12 | 31.6 |
| No | 5 | 13.2 | 21 | 55.3 | 26 | 68.4 |
| Dislipidemia | | | | | | |
| Sí | 3 | 7.9 | 6 | 15.8 | 9 | 23.7 |
| No | 5 | 13.2 | 24 | 63.2 | 29 | 76.3 |
| Diabetes Mellitus | | | | | | |
| Sí | 1 | 2.6 | 2 | 5.3 | 3 | 7.9 |
| No | 7 | 18.4 | 28 | 73.7 | 35 | 92.1 |

Cuadro 4. Presencia de tabaquismo y enfermedades crónicas en pacientes muestreados según sexo.

Discusión

Se estudiaron 38 pacientes salvadoreños con diagnóstico confirmado de TVP, quienes se encontraban en control de su enfermedad en clínicas privadas especializadas. En El Salvador, a la fecha y en nuestro conocimiento, no hay estudios que muestren la prevalencia e incidencia de esta enfermedad en la población local. De hecho, existen estudios que hacen énfasis en la falta de información epidemiológica a nivel latinoamericano con respecto a esta entidad³⁷. En el presente estudio, la relación hombre-mujer obtenida fue de 1:3.7, lo cual coincide con lo reportado en el estudio publicado por Rosendaal F. en el año 2016. No obstante, esta puede variar entre grupos étnicos^{37,38}. Similar a los estudios publicados por Vásquez et. al.³⁹ y Silverstein et. al.⁴⁰. realizados en pacientes argentinos y estadounidenses con trombosis venosa profunda, respectivamente, no parece existir una diferencia estadística entre las edades de hombres y mujeres participantes (P=0.791).

En El Salvador, según la Dirección Nacional de Estadística y Censos (DIGESTYC), los departamentos más poblados son, en orden descendente, San Salvador, La Libertad y Santa Ana, lo cual coincide con los datos de procedencia geográfica encontrados en los pacientes del presente estudio, donde el 74% de los participantes provienen de uno de estos departamentos. Un total de 33 pacientes (87%) provienen del área urbana y 5 pacientes del área rural (13%).

El nivel educativo de los participantes fue en un 53% de tipo universitario, esto puede explicarse debido a que al seleccionar pacientes de centros especializados privados existe un sesgo poblacional al no existir un acceso universal a estos servicios.

La etiología de la TVP es de carácter multifactorial, donde condiciones heredadas y adquiridas favorecen un estado de hipercoagulabilidad. Se ha reconocido mundialmente que las mutaciones Factor V Leiden y Protrombina G20210A son las dos principales causantes de trombofilias, reportándose la primera hasta en un 20-50% y la segunda en el 6-18% de pacientes sintomáticos.

Es importante hacer énfasis, que dichas prevalencias han sido reportadas en estudios realizados en Europa y Norteamérica principalmente²¹. Se reconocen frecuencias muy bajas o inexistentes en países de Asia, África y Australia³². En Estados Unidos, Kujovich *et. al.* reportan una prevalencia del Factor V Leiden según etnias del 5.2% en la población caucásica, 2.2% en la población hispanoamericana, 1.25% en nativos americanos, 1.2% en población afroamericana y 0.45% asiáticos americanos¹⁰. De igual manera, la prevalencia de la mutación Protrombina G20210A varía dentro de los diferentes grupos étnicos: se ha reportado que en Estados Unidos la tasa de portadores en personas sanas en general tiene un máximo del 5%, en caucásicos de 3.6%, en hispanos de 3.5%, en afroamericanos hasta de 1.7%, y en amerindios de hasta 0.6%.⁴¹. Poco se sabe de la prevalencia de estas mutaciones tanto en población general como en pacientes con TVP en Latinoamérica, siendo México y Chile los países que más han investigado estas alteraciones.

El presente trabajo es el primero en investigar cuál es la situación en El Salvador con respecto a la frecuencia de estas mutaciones. Se encontró la presencia del genotipo *wild type* para ambos genes estudiados en el 100% de los casos. El Factor V Leiden es una mutación que de acuerdo al análisis de haplotipos se generó hace 21,000 a 34,000 años en un individuo caucásico. Su presencia es consistente con su distribución racial, debido a que la mutación apareció en un período en el que la subpoblación caucásica se había separado de otras subpoblaciones no africanas, hace aproximadamente 40,000 años atrás. Se estima que la existencia de esta mutación en poblaciones indígenas de otros continentes aparte del europeo es nula⁴². Esto se debe a que se considera que es una mutación *de novo* ocurrida en un individuo caucásico de manera aislada, excluyendo la posibilidad de que se trate de una mutación frecuente recurrente⁴³. La búsqueda de esta variante génica en la población salvadoreña se justifica debido a los patrones históricos de migración. La historia de las características genéticas de la población de América

Latina se caracteriza por una diversidad fenotípica que se inicia con las primeras migraciones de grupos humanos provenientes de Asia, y se diversifica aún más a partir de 1492 por la colonización española debido a la migración masiva de población europea y africana predominantemente de sexo masculino, lo que produjo que Latinoamérica esté lejos de ser una población genéticamente homogénea⁴⁴.

En cuanto al método diagnóstico de TVP, a pesar de que la venografía es el *gold standard*, la ultrasonografía Doppler se ha vuelto el método no invasivo de elección para los pacientes a quienes se les sospeche esta entidad clínica, debido a un mayor acceso a este examen, lo cual se refleja en los casos estudiados en el presente trabajo, pues la mayoría de pacientes (89%) fueron diagnosticados por este método⁴⁵. Es interesante destacar que únicamente en un paciente se realizó Dímero D, siendo ésta una prueba utilizada para la predicción de recurrencia⁴⁶.

El objetivo por el cual se evaluó a cada paciente según la clasificación CEAP era determinar si los estadios más avanzados de la enfermedad se correlacionaban con la presencia de mutaciones en los genes de la coagulación estudiados. Al no encontrarse en esta muestra de pacientes ninguna variante en heterocigosidad ni homocigosidad, no es posible realizar tal correlación. Es importante hacer énfasis en que se contó con la participación de pacientes en todos los estadios clínicos, a excepción del estadio cero.

En los pacientes estudiados el sitio más frecuente de trombosis fue en miembros inferiores (95%) lo cual coincide con lo descrito por Cote et. al. quienes reportan un 94% de casos de TVP en dicha ubicación anatómica⁴⁷. A pesar que ha sido reportada una alta incidencia de mutaciones en los genes de Factor V y protrombina cuando existen coágulos en localizaciones atípicas, en este estudio no se encontró ninguna mutación en tales pacientes.

La presentación recurrente de eventos trombóticos y el antecedente de abortos se han encontrados asociados a la presencia de ambas mutaciones hasta en un 50% de los pacientes

con TVP¹⁰ en ciertas poblaciones, pero nuestros hallazgos difieren con respecto a lo reportado a nivel mundial ya que aunque los pacientes presentaban estas características en múltiples ocasiones, no se encontraron las mutaciones, lo cual no descarta que puedan existir otros factores de riesgo de carácter genético que predispongan a esta condición, tales como la mutación del gen de Metilentetrahidrofolato reductasa, deficiencia de antitrombina III, y deficiencia de la proteína C y proteína S.

Cabe destacar que la mayor parte de los pacientes estudiados (76%) se encontraban con un IMC mayor o igual a 25, lo cual nos parece relevante tomando en cuenta que la obesidad es un factor de riesgo crónico que lleva a una mayor posibilidad de presentar un evento trombótico. No obstante, a la fecha no existe evidencia de peso que haya permitido determinar cuál es el riesgo relativo de TVP en pacientes con esta condición⁴⁸.

Dentro de las comorbilidades que favorecen a la formación de un estado de hipercoagulabilidad, al producir una alteración del endotelio, se han descrito la diabetes mellitus, la hipertensión arterial y la dislipidemia, así como un factor de riesgo exógeno como es el tabaquismo. No obstante, la presencia de estos de manera conjunta en uno o más de los pacientes estudiados fue inexistente. La comorbilidad más frecuente (31.6% n=12) de las estudiadas fue la hipertensión arterial, seguido de dislipidemia (23.7% n=9) y diabetes mellitus (7.9% n=3), cabe destacar que el 89.5% (n=34) de los pacientes son no tabaquistas, lo cual se vuelve llamativo al ser estos factores de riesgo que aumentan la predisposición de las personas a desarrollar un cuadro de TVP^{4,5}.

Finalmente, cabe destacar que con el tamaño de muestra del estudio no es posible concluir que estas mutaciones estén ausentes en la población salvadoreña, pero no parecen ser clínicamente relevantes en pacientes salvadoreños con TVP. Además, no fue posible realizar una asociación con factores de riesgo, congénitos o adquiridos (tabaquismo, hipertensión, diabetes mellitus, dislipidemia) por la ausencia de las variantes génicas mutadas en la muestra.

Limitantes del estudio

- Al tratarse de un trabajo de tesis, el muestreo se debió realizar en un período de tiempo corto, y se ha visto limitado por éste. Esto determina el tamaño de la muestra que puede lograrse, situación que no se presenta en trabajos de investigación de otra índole.
- A pesar del esfuerzo realizado en el ISSS no se logró contactar con los pacientes afiliados a esta institución.

Nota aclaratoria: Inicialmente se contempló realizar el estudio en pacientes con TVP del ISSS. Como primer paso, se sometió el protocolo a revisión metodológica con el Departamento de Docencia e Investigación en Salud de dicha entidad para su aprobación, entregando la primera versión del documento el 5 de abril de 2016. Posterior a varias correcciones, el protocolo fue finalmente enviado al Comité de Ética Institucional hasta el día 30 de agosto de 2016, siendo aprobado el día 28 de septiembre de 2016 (Anexo 2).

Inmediatamente se llevó a cabo la revisión de expedientes de pacientes de la consulta externa de hematología y cirugía vascular para encontrar a quienes cumplieran criterios de inclusión del estudio; se recolectaron los números de teléfono y al intentar contactarlos, se verificó que dichos teléfonos no se encontraban actualizados, siendo la mayoría inexistentes al momento. Por todo esto, fue imposible contactar a los pacientes en esta institución.

Tras este impase, debido a que según el cronograma el periodo de recolección de muestras abarcaba de agosto a octubre de 2016, se procedió a contactar clínicas privadas especializadas en trastornos venosos crónicos que estuvieran interesadas en ser parte de la investigación.

- Únicamente se pudo estudiar la presencia de dos genes mutados que predisponen a TVP, si bien se conoce que existen otras mutaciones en genes diferentes que pueden predisponer a la misma enfermedad. Las tiras reactivas del kit ThromboType® (Hain Lifescience, Alemania) detectan puntualmente las variantes génicas de Factor V y Protrombina. Existen otros kits que incluyen mutaciones de otros genes, pero el costo es significativamente mayor.
- No existen estudios epidemiológicos actualizados a nivel nacional que sean de nuestro conocimiento y que describan la incidencia y prevalencia de TVP y que permitan realizar una estimación del tamaño de la muestra necesaria para obtener significancia estadística. Además, la fragmentación que presenta el sistema de salud, dificulta el establecer un consolidado nacional de pacientes con esta patología.

Capítulo VI

Conclusiones

Las mutaciones Factor V Leiden y Protrombina G20210A en pacientes con TVP son frecuentes en ciertas regiones del mundo, pero en otras no se han encontrado o se presentan en frecuencias muy bajas. Se hace necesario investigar el perfil genético propio de cada población para poder establecer el impacto de las mismas en la etiología de la TVP.

En esta muestra de pacientes salvadoreños con TVP, solamente se encontró la variante *wild type* tanto para Factor V como para Protrombina, lo cual podría explicarse por el origen caucásico de ambas mutaciones asociadas a TVP. La gran diversidad genotípica de las poblaciones latinoamericanas vuelve necesarios los estudios que determinen el grado de penetrancia de alelos específicos considerados factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades.

Debido al tamaño muestral no es posible determinar con certeza estadística la ausencia del Factor V Leiden y Protrombina G20210A en los pacientes salvadoreños con TVP. Los hallazgos no permiten establecer una correlación clara entre la presencia de estas mutaciones y la patología. Al no encontrarse mutaciones homocigotas ni heterocigotas, no es posible realizar un análisis de las mismas con la condición clínica de los pacientes ni factores de riesgo precipitantes.

Este estudio contribuye a mostrar que en el país existen las condiciones necesarias para realizar pruebas genéticas y que éstas deben realizarse inicialmente para evaluar la conveniencia o los posibles beneficios de introducir en una población determinada cierto test genético con fines diagnósticos.

Recomendaciones

- Ampliar el tamaño de la muestra estudiada y realizar estudios analíticos para establecer la prevalencia nacional de estas variantes para así definir si es conveniente el uso rutinario de esta prueba en pacientes salvadoreños con TVP e idealmente realizar un panel completo para diagnóstico de trombofilias.
- Realizar otros trabajos de esta índole, ya que son de gran relevancia, pues permitirán evaluar la conveniencia o los posibles beneficios de introducir cierto test genético en una población determinada.
- Aperturar nuevas líneas de investigación haciendo uso de las herramientas del laboratorio de biología molecular para realizar diagnóstico genético de diferentes patologías que beneficien a la población salvadoreña

Glosario

A

ADN: Ácido desoxirribonucleico

C

CEAP: Clasificación para trastornos venosos crónicos, la cual está basada en las manifestaciones clínicas (C), factores etiológicos (E), distribución anatómica (A) y hallazgos fisiopatológicos subyacentes

D

DIGESTYC: Dirección General de Estadística y Censos

DM: Grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultado de una inadecuada secreción o acción de la insulina, o una combinación de ambas.

DUI: Documento único de identidad.

H

Heterocigosidad: Individuo que posee alelos diferentes para un mismo carácter.

Homocigosidad: Individuo que posee los alelos correspondientes a un carácter iguales.

HTA: Hipertensión arterial, es una enfermedad crónica caracterizada por un incremento continuo de las cifras de presión sanguínea en las arterias.

I

IMC: Índice de masa corporal, es una medida de asociación entre la masa y la talla de un individuo.

ISSS: Instituto Salvadoreño del Seguro Social.

N

n: Número de datos.

O

Obesidad: Son las personas con un IMC igual o superior a 30.

OMS: Organización Mundial de la Salud

P

Prevalencia: En epidemiología, se denomina a la proporción de individuos de un grupo o una población que presentan una característica o evento determinado en un momento o en un período determinado.

S

Sobrepeso: personas con un IMC igual o superior a 25.

T

TVP: Trombosis venosa profunda.

V

Valor p: en Estadística, el valor p (a veces conocido simplemente como el p-valor, la p, o bien directamente en inglés p-value) está definido como la probabilidad de obtener un resultado al menos tan extremo como el que realmente se ha obtenido (valor del estadístico calculado), suponiendo que la hipótesis nula es cierta.

W

Wild type: Genotipo más frecuente observado en la naturaleza o designado arbitrariamente como "normal".

Anexos

Anexo 1

Factores Heredados o Adquiridos de Trombosis Venosa

- Heredados

- Frecuentes

Mutación G1691A en el gen del factor V (factor V Leiden)

Mutación G20210A en el gen de protrombina (factor II)

Mutación homocigota C677T en el gen de metilentetrahidrofolato reductasa.

- Raros

Deficiencia de antitrombina

Deficiencia de Proteína C

Deficiencia de Proteína S

- Muy raros

Disfibrinogenemia

Homocistinuria homocigota

- Probablemente heredados

Niveles aumentados de Factor VIII, Factor IX, Factor XI o fibrinógeno

- Adquiridos

Cirugía y trauma

Inmovilización prolongada

Edad avanzada

Cáncer

Desórdenes mieloproliferativos

Trombosis previa

Embarazo y puerperio

Uso de anticonceptivos o terapia de reemplazo hormonal

Resistencia a la Proteína C activada que no es debida a alteraciones en el gen del Factor V

Anticuerpos antifosfolípidos

Hiperhomocisteinemia leve a moderada

Factores Heredados o adquiridos de Trombosis Venosa Profunda. Tomado de: Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic Susceptibility to Venous Thrombosis. New England Journal of Medicine. 2001; 344(16): 1222-31

Anexo 2

Consentimiento Informado

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DR. "LUIS EDMUNDO VÁSQUEZ" ESCUELA DE
MEDICINA

Tema de investigación: Variantes genéticas del Factor V y Protrombina presentes en pacientes salvadoreños con Trombosis Venosa Profunda y su relevancia clínica

Este documento contiene información sobre un estudio, incluyendo los beneficios y riesgos que éste implica para su salud. Si tiene alguna duda favor consulte a su médico. Puede tomar con usted una copia del documento para discutirlo con su familia, si así lo desea.

1. Investigadores

| Nombre | Título | Cargo | Institución | Teléfono |
|-----------------------------|---------------------------|--------------|-------------|-----------|
| Br. Juan Alfredo Castillo | Médico en Servicio Social | Investigador | UJMD | 7749-3535 |
| Br. Melissa Alejandra Mejía | Médico en Servicio Social | Investigador | UJMD | 7190-9133 |
| Br. Giordano José Sosa | Médico en Servicio Social | Investigador | UJMD | 7989-5125 |
| Lic. María Isabel Giménez | Licenciada en Biología | Asesora | UJMD | 2278-1011 |

Nombre y firma del Encuestador: _____

2. Justificación de la Investigación

Usted ha sido invitado a participar en un estudio de investigación. Por favor lea cuidadosamente este documento y asegúrese de entender todo el contenido.

La trombosis venosa profunda (TVP), es una enfermedad que consiste en la formación de un coágulo en una vena de gran calibre, usualmente en los miembros inferiores a nivel de las piernas, muslos o pelvis, aunque también pueden producirse en los miembros superiores. No todas las personas tienen el mismo riesgo para padecer de TVP, ya que existen factores de

riesgo que pueden ser adquiridos y/o heredados los cuales predisponen a la formación de coágulos.

Entre los factores de riesgo adquiridos se encuentran: obesidad, edad avanzada, embarazo, cáncer, uso de anticonceptivos orales y terapia de reemplazo hormonal.

Entre los factores de riesgo heredados existen variantes genéticas como: Factor V Leiden, mutación del gen de Protrombina, mutación del gen de Metilentetrahidrofolato reductasa, deficiencia de antitrombina III, y deficiencia de la proteína C y proteína S.

Justificándose la búsqueda de estas variantes en situaciones específicas tales como: aparecimiento de TVP por primera vez antes de los 50 años y después de los 50 años de edad en ausencia de malignidad, TVP en sitios inusuales (vasos cerebrales, mesentéricos o hepáticos), TVP recurrente, TVP durante el embarazo, en el período postparto o en mujeres que toman anticonceptivos orales o bajo terapia de reemplazo hormonal, mujeres con abortos inexplicables y familiares adultos asintomáticos de pacientes con TVP documentada. En estos pacientes, el diagnóstico de mutaciones genéticas es un pilar en la evaluación del riesgo de recurrencia y morbilidad a corto y largo plazo.

3. Objetivos de la investigación

El propósito del presente estudio es conocer la relevancia clínica y la frecuencia de las variantes genéticas Factor V Leiden y Protrombina G20210A en la ocurrencia de trombosis venosa profunda.

4. Beneficios de la investigación

Consistirán en la adopción de medidas preventivas para evitar la recurrencia de problemas trombóticos tanto en usted como en sus familiares si se sospechara que alguno de ellos pudiese poseer alguno de los factores genéticos en estudio. Al formar parte de esta investigación, obtendrá mayor conocimiento para prevenir nuevos eventos trombóticos al

brindársele un diagnóstico genético de su enfermedad, ya que es la primera vez que se realiza a nivel nacional.

5. Procedimientos de la investigación

Se seleccionarán aquellos pacientes que cumplan con los criterios o condiciones para participar en el estudio. A cada paciente seleccionado se le brindará una copia de este documento, con del explicarles el estudio e invitarlos a participar en él. Se obtendrá luego el consentimiento informado por escrito de quienes estén de acuerdo en participar, explicándoles la forma correcta de llenar este documento. Se creará una ficha de información personal para cada paciente participante.

Se realizará la toma de una muestra única de sangre, la cual será utilizada para realizar un diagnóstico genético. Dicha muestra posterior a su análisis y estudio será desechada y no se ocupará para otros fines. Posteriormente, se le comunicará el día de la entrega de los resultados, es decir, si usted tiene algún factor genético que le predispone a la formación de coágulos.

6. Participación

Usted es libre de participar en este estudio. Será su responsabilidad asistir a la entrega de los resultados y a las citas de control que su médico le indique, así como seguir en forma correcta el tratamiento que se le recomiende.

7. Alternativas

No se cuenta con otra alternativa de diagnóstico genético dentro del estudio, por lo que si usted no está de acuerdo con el método diagnóstico ofrecido no podrá formar parte del estudio.

8. Compensación

No existirá remuneración monetaria por su participación en este estudio.

9. Riesgos asociados al estudio.

No existen riesgos directos para la salud del paciente por la realización de este examen, a excepción de dolor leve y enrojecimiento de la piel al momento de la toma de la muestra de sangre.

10. Confidencialidad de la información

Tanto los autores como la Comisión de Investigación Científica de la Facultad de Ciencias de la Salud “Dr. Luis Edmundo Vásquez” de la UJMD y las autoridades reguladoras tendrán libre acceso a su expediente clínico original como participante, para la verificación de los procedimientos y/o datos del estudio clínico sin violar su confidencialidad. Esta información será utilizada con el mayor sentido de la privacidad y no será guardada para su utilización futura en otros estudios.

11. Retiro voluntario

Su participación en este estudio es voluntaria. Usted puede decidir no participar o retirarse en cualquier momento. La decisión no resultará en ninguna penalidad o pérdida de los beneficios para los cuales tenga derecho, por lo que seguirá siendo tratado aún fuera del estudio. Se le informará si se dispone de nueva información que pueda influir en su decisión de continuar participando.

Al firmar a continuación, usted acepta que ha comprendido todo el contenido presentado anteriormente y que está de acuerdo en participar en el estudio bajo las condiciones, riesgos y beneficios que han sido descritos en este documento.

Yo _____,
con DUI No. _____ acepto voluntariamente participar en esta
investigación, el día _____ del mes de _____ del 2016.

Firma o Huella

Anexo 3

Ficha Clínica

Fecha: _____

CÓDIGO DE PACIENTE: _____

| Datos generales | |
|---------------------------------------|--|
| Nombre | |
| Sexo | <input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino |
| Edad | |
| Teléfono | Cel: |
| Correo electrónico | |
| Escolaridad | |
| Área geográfica | |
| Talla | |
| Peso | |
| IMC | |
| Diagnóstico de TVP | |
| Fecha de diagnostico | |
| Método diagnostico | |
| Sitio de trombosis | |
| Datos de Doppler (si está disponible) | |
| Manejo de TVP | |

| | | | |
|-------------------------------|-------------|----------------------------|------|
| Numero de eventos trombóticos | | | |
| Antecedentes | | | |
| Tabaquista | | Índice paquete año: | |
| Diabetes Mellitus | | Hipertensión arterial: | |
| Dislipidemia | | Familiares con hx de TVP: | |
| Abortos previos | | Uso actual de ACO's o TRH: | |
| Ant. de Placenta previa | | Tx Qx de TVP | |
| Complicaciones | | | |
| Pruebas genéticas | Homocigosis | Heterocigosis | Sano |
| FVL | | | |
| Protrombina G20210A | | | |

Notas: _____

Anexo 4

Protocolo de extracción de ADN

PROTOCOLO QIAamp DNA Mini

Agregar la cantidad necesaria de etanol 96-100% al Buffer AW1 y AW2, cuando vayan a ser usados por primera vez.

Agitar bien el Buffer AL antes de usar.

1. Agregar 20 uL de Proteinasa K al fondo de un tubo de 1.5 mL
2. Añadir 200 uL de la muestra.
3. Añadir 200 uL de Buffer AL a la muestra y mezclar con vórtex por 15 seg.
4. Incubar en baño maría a 56° por 10 min.
5. Centrifugar brevemente los tubos, para eliminar las gotas del interior de la tapa.
6. Añadir 200 uL de etanol (96-100%) a cada muestra y mezclar por vórtex durante 15 seg.
Luego centrifugar para eliminar gotas de la tapa.
7. Pasar la mezcla del paso anterior a una columna mini spin, debidamente colocada sobre un tubo colector de 2 mL. Cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm (6000 g) por 1 min.
Colocar la columna en un tubo colector nuevo y descartar el tubo con el filtrado.
NOTA: Centrifugar nuevamente si la columna no quedara vacía.
8. Añadir 500 uL de Buffer AW1 a la columna mini spin. Cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm (6000 g) por 1 min. Colocar la columna en un tubo colector nuevo y descartar el tubo con el filtrado.
9. Añadir 500 uL de Buffer AW2 a la columna mini spin. Cerrar la tapa y centrifugar a máxima velocidad (14,000 rpm o 20,000 g) por 3 min.

10. Recomendado: descartar el tubo colector con el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo colector (no incluido). Centrifugar a máxima velocidad por 1 min y descartar el nuevo filtrado.
11. Colocar la columna mini spin en un tubo limpio de 1.5 uL. Añadir 100 uL de buffer AE o agua destilada. Incubar a T° ambiente por 1 min. Centrifugar a 8000 rpm (6000 g) por 1 min. NOTA: se puede incubar por 5 min y eluir en 200 uL.

Anexo 5

Gel de agarosa (Confirmación de extracción de ADN por electroforesis)

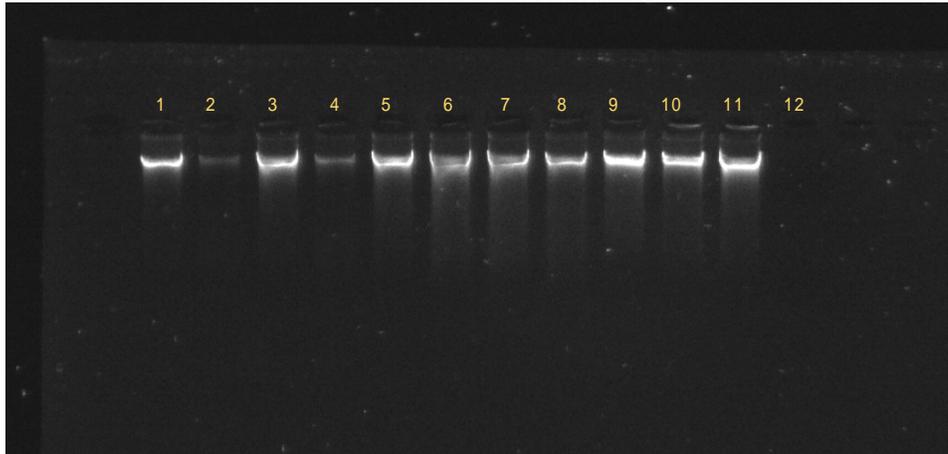


Figura 1. Evidencia de extracción de ADN, muestras del 29 de septiembre de 2016. Se colocó el control negativo en el pocillo 12, en donde no se observó material genético. Fotografía tomada por equipo investigador.

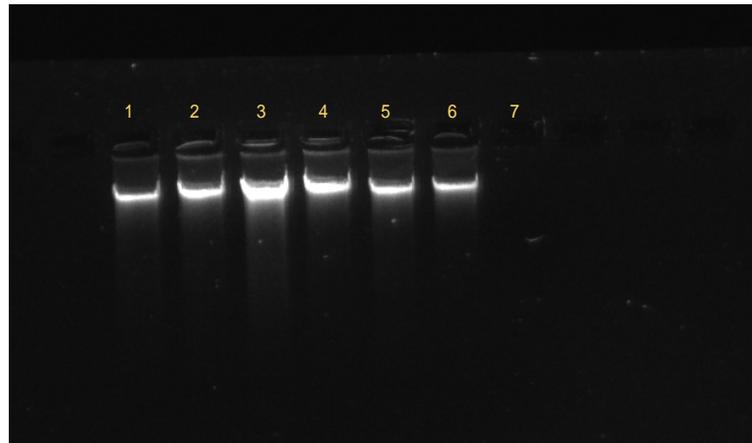


Figura 2. Evidencia de extracción de ADN, muestras del 10 de octubre de 2016. Se colocó el control negativo en el pocillo 7, en donde no se observó material genético. Fotografía tomada por equipo investigador.

Gel de agarosa (Confirmación de PCR por electroforesis)

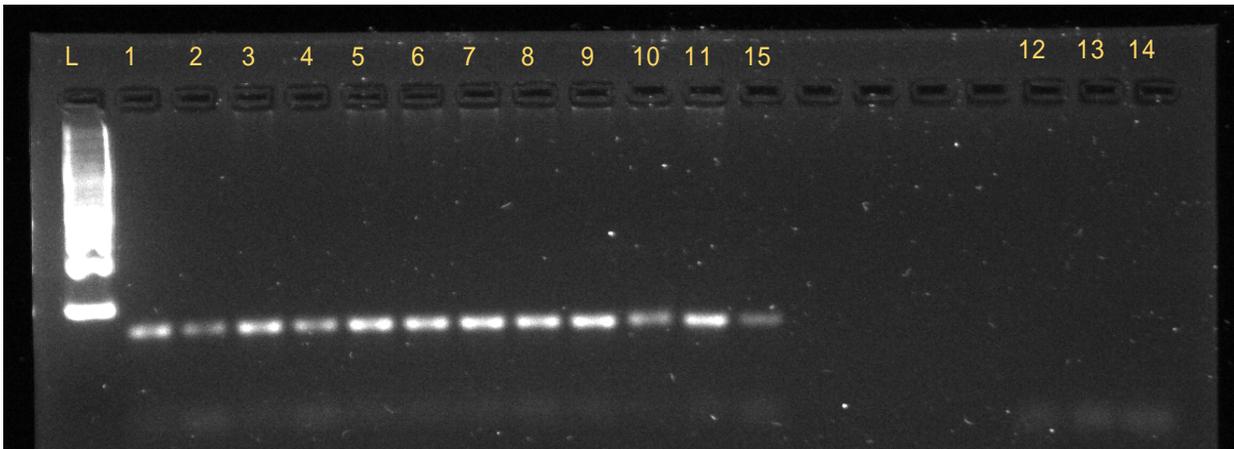


Figura 3. Amplicones de PCR. Como se evidencia en la fotografía, en todas las muestras se amplificó material genético. Los últimos 3 pocillos a la derecha (12, 13, 14) corresponden a los controles negativos. El pocillo 15 contiene el control positivo de ADN humano.

L: marcador de tamaño molecular

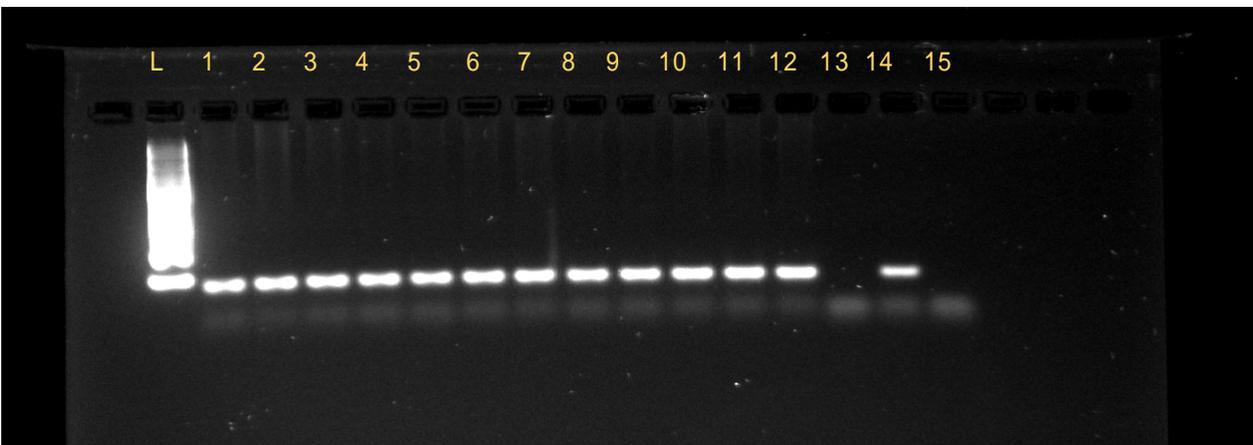


Figura 4. Amplicones de PCR. Los controles negativos fueron colocados en los pocillos 13 y 15, mientras que el control positivo de ADN humano se colocó en el pocillo 14.

L: marcador de tamaño molecular

Anexo 6

Protocolo de hibridación

THROMBO TYPE

HIBRIDACIÓN

1. Precaentar HYB (verde) y STR (rojo) a 37-45° en baño maría. Verificar que no tengan precipitado y mezclar.
2. Poner a Temperatura Ambiente los reactivos DEN, RIN, CON-D y SUB-D.
3. Preparar las diluciones del Conjugado y del Sustrato.

| Reactivo | Volumen por TIRA | N° de TIRAS | Volumen TOTAL |
|--------------|------------------|-------------|---------------|
| CON-C | 10 uL | | |
| CON-D | 1 mL | | |

| Reactivo | Volumen por TIRA | N° de TIRAS | Volumen TOTAL |
|--------------|------------------|-------------|---------------|
| SUB-C | 10 uL | | |
| SUB-D | 1 mL | | |

4. Colocar 20 uL de solución DEN en una esquina de cada canal a usar.
5. Anadir a la solución DEN, 5-20 uL del producto de PCR. Pipetear para mezclar. Incubar 5 min a T° Ambiente.
6. Extraer las tiras necesarias usando pinzas y marcar cada una con un lápiz, por debajo de la marca coloreada.
7. Añadir a cada pocillo 1 mL de HYB (verde). Agitar suavemente la bandeja hasta obtener un color homogéneo.

8. Colocar una tira en cada canal. Deben quedar cubiertas por la solución y con la marca coloreada mirando hacia arriba (usar pinzas para darles vuelta en caso necesario).

NOTA: LIMPIAR LAS PINZAS DESPUÉS DE TOCAR CADA TIRA

9. Incubar la bandeja en agitación, a 45° por 30 min.

10. Aspirar a solución HYB.

11. Añadir a cada pocillo 1 mL de STR (rojo) e incubar a 45° por 15 min en agitación.

12. Trabajar a T° Ambiente a partir de este paso.

13. Aspirar toda la solución STR. Eliminar cualquier resto de fluido colocando la bandeja boca abajo y golpeando suavemente sobre papel absorbente. (Hacer lo mismo en cada paso de lavado)

14. Añadir a cada tira 1 mL de solución RIN, e incubar por 1 min en agitación.

15. Aspirar toda la solución RIN. Eliminar cualquier resto de fluido colocando la bandeja boca abajo y golpeando suavemente sobre papel absorbente

16. Añadir 1 mL del Conjugado diluido a cada tira, e incubar por 30 min en agitación.

17. Eliminar toda la solución y lavar 2 veces con 1 mL de RIN por 1 min en agitación.

18. Lavar con 1 mL de agua destilada por 1 min. Eliminar cualquier resto de agua al finalizar.

19. Añadir 1 mL de Sustrato diluido a cada tira e incubar sin agitar, y protegido de la luz. (3-20 min)

20. Detener la reacción en cuanto las bandas sean claramente visibles, lavando brevemente dos veces con agua destilada.

21. Utilizando pinzas, retirar las tiras de la bandeja y secarlas entre dos hojas de papel absorbente.

Anexo 7

Interpretación de tiras reactivas Kit ThromboType

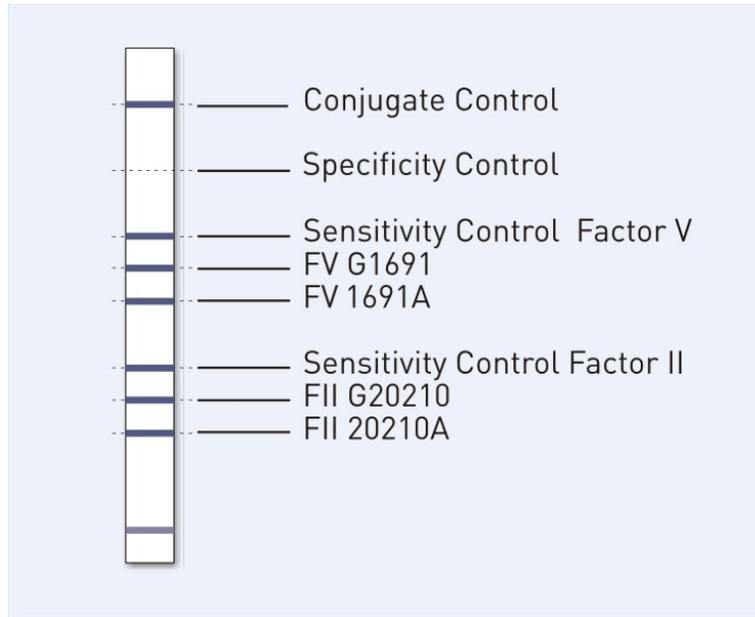


Figura 5. Esquema de interpretación de resultados de tira reactiva de hibridación.

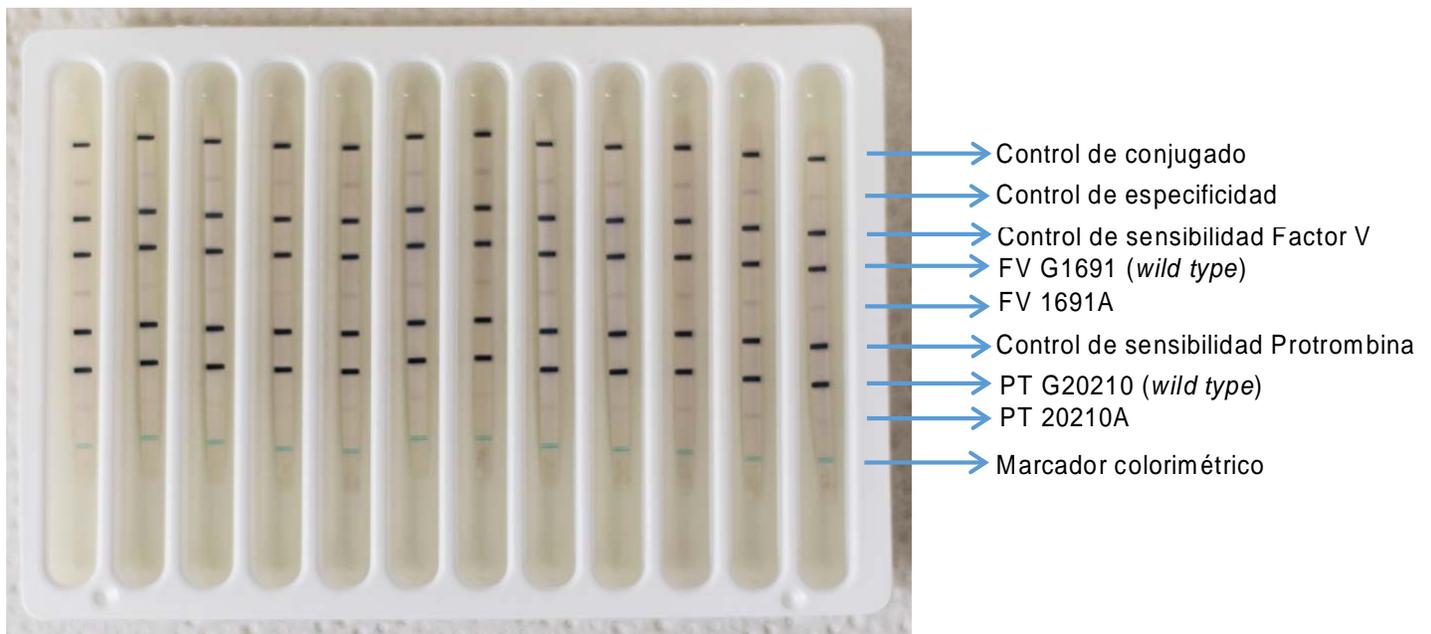


Figura 6. Tiras reactivas ya procesadas en Laboratorio de Biología Molecular.

Anexo 8

Tiras reactivas del Kit ThromboType



ThromboType® 96

VER 2.0
00241-0507-03-5

| | | |
|----|----|------|
| | | |
| dd | mm | yyyy |

| | | | |
|----------|-----------|------------|------------|
| FV-G1691 | FVL-1691A | FII-G20210 | FII-20210A |
|----------|-----------|------------|------------|

| | | | |
|---|---|---|---|
| # |  |  |  |
|---|---|---|---|

| | | |
|----|--|---|
| CC | | M |
|----|--|---|

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | | |
|--|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

| |
|--|
| |
|--|



ThromboType® 96

VER 2.0
00241-0507-03-5

| | | |
|----|----|------|
| | | |
| dd | mm | yyyy |

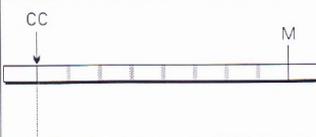
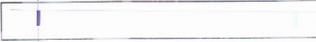
| # | | | | CC | M | FV-G1691 | FVL-1691A | FII-G20210 | FII-20210A |
|----|--------|---|---|----|---|----------|-----------|------------|------------|
| 1 | 10-01 | ✓ | | | | ✓ | | ✓ | |
| 2 | 10-03 | ✓ | | | | ✓ | | ✓ | |
| 3 | 1004 | ✓ | | | | ✓ | | ✓ | |
| 4 | 1006 | ✓ | | | | ✓ | | ✓ | |
| 5 | 1007 | ✓ | | | | ✓ | | ✓ | |
| 6 | 1008 | ✓ | | | | ✓ | | ✓ | |
| 7 | 1009 | ✓ | | | | ✓ | | ✓ | |
| 8 | 1011 | ✓ | | | | ✓ | | ✓ | |
| 9 | 1012 | ✓ | | | | ✓ | | ✓ | |
| 10 | 1013 | ✓ | | | | ✓ | | ✓ | |
| 11 | 1014 | ✓ | | | | ✓ | | ✓ | |
| 12 | HCT | | ✓ | | | | | | |
| 13 | 0901 | | | | | ✓ | | ✓ | |
| 14 | 1301 | | | | | ✓ | | ✓ | |
| 15 | 1302 | | | | | ✓ | | ✓ | |
| 16 | 1702 | | | | | ✓ | | ✓ | |
| 17 | 1703 | | | | | ✓ | | ✓ | |
| 18 | 1705 | | | | | ✓ | | ✓ | |
| 19 | ✓ 0801 | | | | | ✓ | | ✓ | |
| 20 | ✓ 0802 | | | | | ✓ | | ✓ | |
| 21 | ✓ 0803 | | | | | ✓ | | ✓ | |
| 22 | ✓ 1501 | | | | | ✓ | | ✓ | |
| 23 | ✓ 1502 | | | | | ✓ | | ✓ | |
| 24 | ✓ 1503 | | | | | ✓ | | ✓ | |

LOT _____
 HYB _____ min
 STR _____ min
 SUB _____ min

ThromboType[®] 96

VER 2.0
00241-0507-03-5

| | | |
|----|----|------|
| | | |
| dd | mm | yyyy |

| # |  |  |  |  | FV-G1691 | FVL-1691A | FII-G20210 | FII-20210A |
|----|---|---|---|--|-------------------------------------|-----------|-------------------------------------|------------|
| 25 | HCL | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 26 | C(-) | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 27 | L 07-01 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 28 | L 07-02 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 29 | L 07-03 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 30 | L 07-04 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 31 | L 07-05 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 32 | L 07-06 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 33 | L 07-07 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 34 | L 08-01 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 35 | L 08-02 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 36 | L 08-03 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 37 | L 08-04 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 38 | L 08-05 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 39 | L 08-06 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 40 | L 17-01 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 41 | L 17-02 | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 42 | HCL | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 43 | C(-) | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| | | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | | |
| | | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | | |
| | | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | | |
| | | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | | |
| | | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | | |
| | | | |  | <input checked="" type="checkbox"/> | | | |

LOT _____
  HYB _____ min
  STR _____ min
  SUB _____ min



Anexo 9

Aprobación del Comité de Ética del ISSS

INSTITUTO SALVADOREÑO DEL SEGURO SOCIAL
COMITÉ ETICO PARA LA INVESTIGACION EN SALUD 2016-2019

A. IDENTIFICACION

1. Código: (año más 3 dígitos separado por guion):

2016-025R

2. Título del protocolo:

Variantes Genéticas del Factor V y Protrombina en pacientes del ISSS con Trombosis Venosa Profunda

3. Investigador principal:

BR. JUAN ALFREDO CASTILLO ESCOBAR, BR MELISSA ALEJANDRA MEJÍA BAUTISTA BR GIORDANO JOSÉ SOSA SOTO

4. Patrocinador:

no

5. Tipo de estudio:

DESCRIPTIVO

ninguno

ninguno

ninguno

6. Control de calidad interno(placebo) :

7. Sujeto de investigación:

Revisión de expedientes clínicos en personas con trombosis venosa profunda

COEFICIENTE DE VALIDEZ

0.70

INTERPRETACION

APROBADO

Fecha

20/09/2016

Conclusión

Protocolo para revisión de expediente clínico considerado de bajo riesgo con coeficiente de validez APROBADO, Investigador principal ha brindado aclaraciones a las observaciones por el CEIS ISSS 2016-2019

Miembros asistentes

Licda Reina Hernandez de Carpio

Licda Ena Lopez Herrador

Sr Catarino Moran

Dra Claudia Lopez de Blanco

Lcda. María Isabel Quintanilla

Presidente

Dr Rafael Balrons Orellana



La investigación es un privilegio, no un derecho

OBSERVACION: Se considera una investigación de riesgo bajo, sugerencia considerar que los resultados descriptivos esperados solo aplican para tres o cuatro variables de las analizadas, en el resto de variables solo podrá interpretar frecuencias y porcentajes

Deberá presentar informe final previa solicitud de cita en reuniones ordinarias as mas tardar en 6 meses. (cita solicitarla al correo claudia.deblanco)

Anexo 10

Flujograma de procesamiento de muestras

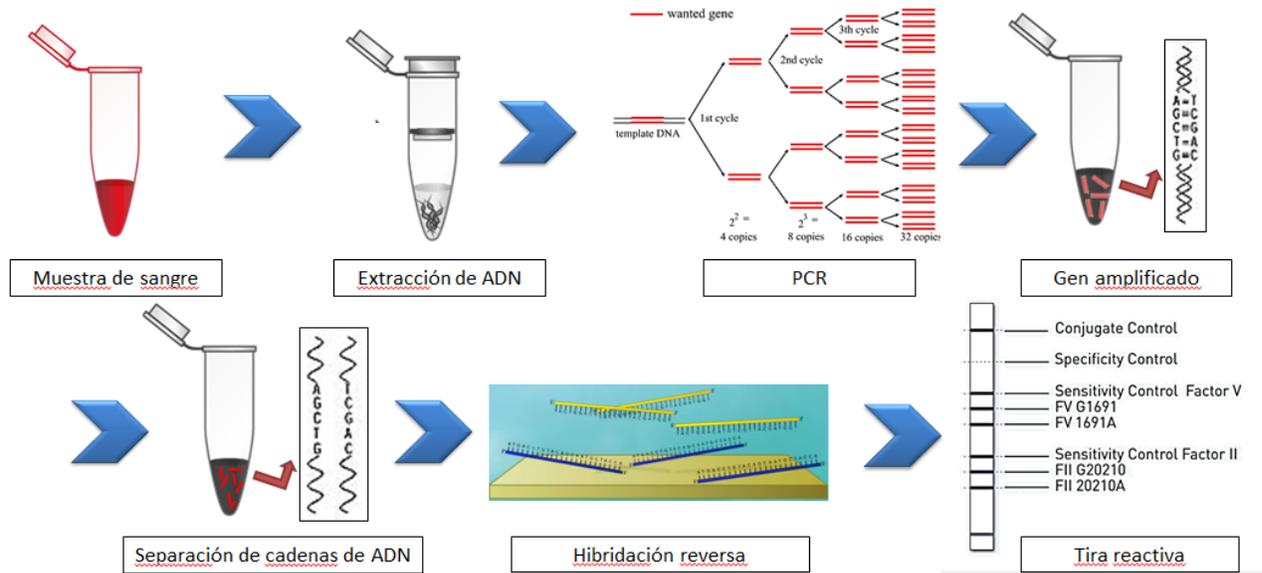


Figura 7. Esquema de proceso de análisis de muestras: Extracción de ADN, Reacción en Cadena de la Polimerasa para amplificación de genes deseados, Separación de cadenas de DNA y uso de tiras de hibridación reversa para identificación de variantes genéticas.

Imagen realizada por equipo investigador.

Referencias bibliográficas

- ¹ Zhao LX, Liu B, Li CS. Progress in research into the genes associated with venous thromboembolism. *World J Emerg Med.* 2015;6(2):100-4. doi: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2015.02.003.
- ² European Genetics Foundation; Cardiovascular Disease Educational and Research Trust; International Union of Angiology; Mediterranean League on Thromboembolism, Nicolaides AN, Breddin HK, Carpenter P, Coccheri S, Conard J, De Stefano V, Elkoofy N, Gerotziapas G, Guermazi S, Haas S, Hull R, Kalodiki E, Kristof V, Michiels JJ, Myers K, Pineo G, Prandoni P, Romeo G, Samama MM, Simonian S, Xenophonstos S. Thrombophilia and venous thromboembolism. International consensus statement. Guidelines according to scientific evidence. *Int Angiol.* 2005 Mar;24(1):1-26.
- ³ Grody WW, Griffin JH, Taylor AK, Korf BR, Heit JA; ACMG Factor V. Leiden Working Group. American College of Medical Genetics consensus statement on factor V Leiden mutation testing. *Genet Med.* 2001 Mar-Apr;3(2):139-48.
- ⁴ Datos TVP y EP NCBDDD | CDC [Internet]. [citado el 3 de febrero de 2016]. Disponible en la World Wide Web: <http://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/dvt/facts.html>
- ⁵ Veiras O, Villa R. Los principales problemas de salud: Trombosis venosa profunda. *Amf.* 2009;5(1):11–20.
- ⁶ Cushman, Mary. "Epidemiology and Risk Factors for Venous Thrombosis." *Seminars in hematology* 44.2 (2007): 62–69.
- ⁷ Beckman MG, Hooper WC, Critchley SE, Ortel TL. Venous Thromboembolism. *American Journal of Preventive Medicine.* 2010; 38(4): S495–501
- ⁸ Arteaga M, Gonzalez R, Ortega E, Castellanos H, Jimenez A, Angel V. Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedad Tromboembólica Venosa. Cenetec [Internet]. 2010; 3–76. Disponible en la World Wide Web: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/437_GPC_Enf_tromboembolica_venosa/GER_Enfermedad_tromboembolica_venosa.pdf
- ⁹ Palomo G I, Pereira G J, Alarcón L M, Pinochet P C, Sm V, T M, et al. Factor V Leiden y mutación de la protrombina G20210A en pacientes con trombosis venosa y arterial. *Revista médica de Chile.* 2005; 133(12): 1425–33.
- ¹⁰ Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med.* 2011;13(1):1–16.
- ¹¹ Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet.* 1995; 346 (8983): 1133–4.
- ¹² Guzmán N, Salazar LA. Frequency of prothrombotic risk factors in patients with deep venous thrombosis and controls: their implications for thrombophilia screening in Chilean subjects. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2010; 14(5): 599–602.
- ¹³ Primary thrombophilia in Mexico. II. Factor V G1691A (Leiden), prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in t... - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 6 de marzo de 2016]. Disponible en la World Wide Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11426488>

-
- ¹⁴ Tirado I, Mateo J, Soria JM, Oliver A, Borrell M, Coll I, et al. Contribution of prothrombin 20210A allele and factor V Leiden mutation to thrombosis risk in thrombophilic families with other hemostatic deficiencies. *Haematologica*. 2001 Nov;86(11):1200–8.
- ¹⁵ Francès F, Portolès O, Gabriel F, Corella D, Sorlí JV, Sabater A, et al. Comparación de las frecuencias de los alelos factor V Leiden (G1691A) y protrombina-G20210A entre pacientes con trombosis venosa profunda y población general mediterránea española. *Revista médica de Chile*. 2006; 134(1): 13–20.
- ¹⁶ Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994 May 5;369(6475):64-7.
- ¹⁷ Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996 Nov 15;88(10):3698-703.
- ¹⁸ Hernández-Cuervo H, Usme S, Yunis JJ. Genotipos frecuentemente asociados a trombofilias. *Biomedica*. 2013; 34(1): 132–42.
- ¹⁹ Martínez-Murillo, C. Mecanismos de activación de la coagulación. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc [Internet]*. 2006;51–8. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2006/ims062l.pdf>
- ²⁰ Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic Susceptibility to Venous Thrombosis. *New England Journal of Medicine*. 2001; 344(16): 1222–31.
- ²¹ Martinelli I, Passamonti SM, Bucciarelli P. Thrombophilic states. *Handb Clin Neurol*. 2014;120:1061–71
- ²² Cohn DM, Roshani S, Middeldorp S. Thrombophilia and venous thromboembolism: implications for testing. *Semin Thromb Hemost*. 2007 Sep;33(6):573–81.
- ²³ Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al., editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 17th ed. New York: McGraw Hill; 2008.
- ²⁴ Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group. Recommendations from the EGAPP Working Group: routine testing for Factor V Leiden (R506Q) and prothrombin (20210G>A) mutations in adults with a history of idiopathic venous thromboembolism and their adult family members. *Genet Med*. 2011; 13(1): 67–76.
- ²⁵ Lacayo-Leñero D, Hernández-Hernández D, Valencia-Martínez A, Barrales-Benítez O, Vargas-Ruiz AG.
- ²⁶ Palomo G I, Pereira G J, Alarcón L M, Pinochet P C, Sm V, T M, et al. Factor V Leiden y mutación de la protrombina G20210A en pacientes con trombosis venosa y arterial. *Revista médica de Chile*. 2005 Dec;133(12):1425–33.

-
- ²⁷ Kujovich JL. Factor V Leiden Thrombophilia. En: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJ, et al., editores. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [citado el 26 de febrero de 2016]. Disponible en la World Wide Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1368/>
- ²⁸ Saeed A, Sumreen, Kashif MA. To determine the frequency of Factor V Leiden in cases of Deep Vein Thrombosis and Healthy controls. *Pak J Med Sci.* 2015; 31(5): 1219–22.
- ²⁹ Learning about Factor V Leiden Thrombophilia [Internet]. [citado el 26 de febrero de 2016]. Disponible en la World Wide Web: <https://www.genome.gov/15015167>
- ³⁰ Sergi C, Al Jishi T, Walker M. Factor V Leiden mutation in women with early recurrent pregnancy loss: a meta-analysis and systematic review of the causal association. *Arch Gynecol Obstet.* 2015; 291(3): 671-9.
- ³¹ Muñoz M, Vilos C, Cantín M. Prothrombin C20209T mutation in deep vein thrombosis: a case report. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(7): 11225–9.
- ³² Varga EA, Moll S. Prothrombin 20210 Mutation (Factor II Mutation). *Circulation.* 2004 Jul 20;110(3):e15–8.
- ³³ Liatsikos SA, Tsikouras P, Manav B, Csorba R, von Tempelhoff GF, Galazios G. Inherited thrombophilia and reproductive disorders. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2016;17(1):45–50.
- ³⁴ Polymerase chain reaction / PCR | Learn Science at Scitable [Internet]. [citado 11 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://www.nature.com/scitable/definition/polymerase-chain-reaction-pcr-110>
- ³⁵ Franchini M. Utility of testing for factor V Leiden. *Blood Transfus.* 2012;10(3):257–9.
- ³⁶ Vásquez MA, Rabe E, McLafferty RB, Shortell CK, Marston WA, Gillespie D, Meissner MH, Rutherford RB; American Venous Forum Ad Hoc Outcomes Working Group. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. *J Vasc Surg.* 2004 Dec;40(6):1248-52.
- ³⁷ ISTH Steering Committee for World Thrombosis Day. Thrombosis: a major contributor to the global disease burden. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 1580–90.
- ³⁸ Rosendaal FR. Causes of venous thrombosis. *Thrombosis Journal.* 2016;14(1):24.
- ³⁹ Vázquez FJ, Posadas-Martínez ML, Vicens J, González Bernaldo de Quirós F, Giunta DH. Incidence rate of symptomatic venous thromboembolic disease in patients from a medical care program in Buenos Aires, Argentina: a prospective cohort. *Thrombosis Journal.* 2013;11:16.
- ⁴⁰ Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 27 de noviembre de 2016]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521222>
- ⁴¹ Dziadosz M, Baxi L. Global prevalence of prothrombin gene mutation G20210A and implications in women's health: a systematic review. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2016, 27:481–489

-
- ⁴² van Mens TE, Levi M, Middeldorp S. Evolution of Factor V Leiden. *Thromb Haemost.* 2013;110(1):23-30. doi: 10.1160/TH13-02-0115. Epub 2013 Apr 25.
- ⁴³ Zivelin A, Griffin J, Xu X, Pabinger I, Samama M, Conard J, Brenner B, Eldor A, Seligsohn U. A Single Genetic Origin for a Common Caucasian Risk Factor for Venous Thrombosis. *Blood.* 1997; 89 (2): 397-402
- ⁴⁴ Adhikari K, Mendoza-Revilla J, Chacón-Duque JC, Fuentes-Guajardo M, Ruiz-Linares A. Admixture in Latin America. *Curr Opin Genet Dev.* 2016; 41:106-114. doi: 10.1016/j.gde.2016.09.003
- ⁴⁵ Compression ultrasonography for diagnostic management of patients with clinically suspected deep vein thrombosis: prospective cohort study | *The BMJ* [Internet]. [citado 29 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://www.bmj.com/content/316/7124/17?referer=www.clickfind.com.au>
- ⁴⁶ A systematic review of clinical prediction scores for deep vein thrombosis [Internet]. [citado 29 de noviembre de 2016]. Disponible en la World Wide Web: <http://phl.sagepub.com/content/early/2016/11/24/0268355516678729.abstract>
- ⁴⁷ Cote LP, Greenberg S, Caprini JA, Tafur A, Choi C, Muñoz FJ, Skride A, Valero B, Porras JA, Ciammaichella M, Hernández-Blasco LM, Monreal M; RIETE Investigators. Comparisons Between Upper and Lower Extremity Deep Vein Thrombosis: A Review of the RIETE Registry. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2016 Aug 29. pii: 1076029616663847. [Epub ahead of print]
- ⁴⁸ Lentz SR. Thrombosis in the setting of obesity or inflammatory bowel disease. *Blood.* 2016;128(20):2388-2394.