



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE LOS POLIMORFISMOS FACTOR
V DE LEIDEN (G1691A), FACTOR II PROTROMBINA (G20210A), MTHFR
C677T, MTHFR A1298C, Y PAI-1 (4G/5G) EN UNA POBLACIÓN MESTIZA
RESIDENTE EN EL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc Germán Burgos Figueroa

Autora

Paola Alexandra Yáñez Castillo

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación de la frecuencia de los polimorfismos Factor V de Leiden (G1691A), Factor II Protrombina (G20210A), MTHFR C677T, MTHFR A1298C, y PAI-1 (4G/5G) en una población mestiza residente en el Distrito Metropolitano de Quito, a través de reuniones periódicas con el estudiante Paola Alexandra Yáñez Castillo, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Germán Burgos Figueroa

Máster en Biología

C.I. 1721014379

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

Christian Ricardo Rivas Iglesias

Ingeniero en Biotecnología

C.I. 1723461636

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Evaluación de la frecuencia de los polimorfismos en una población mestiza residente en el Distrito Metropolitano de Quito, de Paola Alexandra Yáñez Castillo, en el 201920 dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Andrea Paola Cordero Arroyo

Máster en células madre y Medicina Regenerativa

C.I.1714669825

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Paola Alexandra Yáñez Castillo

C.I. 1752670917

AGRADECIMIENTO

A los Msc Germán Burgos y Stefany Montúfar por ligarme al estupendo mundo de la genética y la investigación, por lo orientación, tiempo y en especial por su valiosa amistad.

A todo el personal que conforma el Servicio de Genética Médica del Hospital de Especialidades Fuerzas Armadas No 1, en especial al Ingeniero Christian Rivas y a la Dr. Arianne Llamas, por su exigencia, dedicación, crítica y aliento.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi madre Mónica Castillo, por su apoyo absoluto, amor, comprensión y sacrificios. Gracias por ser el pilar fundamental en mi vida.

RESUMEN

La trombofilia, se define como un estado patológico que conduce a la trombosis (hipercoagulación provocada por una tendencia a formar trombos en la sangre). La trombosis se considera un trastorno de origen multifactorial, en la que están implicado genes y ambiente. Se han descrito algunos polimorfismos en varios genes que contribuyen al desarrollo de la trombosis. En el presente estudio se evaluó la frecuencia de los polimorfismos Factor V de Leiden (G1691A) (rs6025), Factor II Protrombina (G20210A) (rs1799963), MTHFR C677T (rs1801133), MTHFR A1298C (rs1801131), y PAI-1 (4G/5G) (rs1799762), en 168 individuos de etnia mestizo-ecuatoriana residentes en el Distrito Metropolitano de Quito. Para cumplir este objetivo, se obtuvo ADN a partir de sangre periférica, previo consentimiento informado. El análisis molecular que se efectuó para determinar de las frecuencias genotípicas y alélicas fue la técnica de PCR en tiempo real utilizando la plataforma *LightCycler®2,0*. En este estudio se encontró un predominio del genotipo salvaje (wild type), en los 5 polimorfismos. Se observó una alta frecuencia del alelo T del polimorfismo MTHFR C677T y ausencia del genotipo A/A en los polimorfismos G1691A y G20210A. La investigación concluye que las frecuencias de estos 5 polimorfismos tienen una alta similitud a las frecuencias de poblaciones sudamericanas y españolas, esto podría deberse posiblemente a patrones de mestizaje. La ausencia de los genotipos A/A, podría ser resultado de alelos deletéreos. Por los resultados obtenidos junto a la bibliografía consultada, se presume que la alta frecuencia del alelo T, del polimorfismo MTHFR C677T puede deberse a un papel protector y al consumo de folato.

ABSTRACT

Thrombophilia is defined as a pathological state that leads to thrombosis (hypercoagulation caused by a tendency to form thrombi in the blood). Thrombosis is considered a disorder of multifactorial origin, in which genes and environment are involved. Some polymorphisms in several genes that contribute to the development of thrombosis have been described. In the present study, the frequency of Leiden Factor V polymorphisms (G1691A) (rs6025), Prothrombin Factor II (G20210A) (rs1799963), MTHFR C677T (rs1801133), MTHFR A1298C (rs1801131), and PAI-1 (4G) (rs1799762), in 168 individuals of Mestizo-Ecuadorian ethnicity residing in the Metropolitan District of Quito. To meet this objective, DNA was obtained from peripheral blood, with prior informed consent. The molecular analysis that was carried out to determine the genotypic and allelic frequencies was the real-time PCR technique using the LightCycler®2.0 platform. In this study a predominance of the wild type (wild type) was found in the 5 polymorphisms. A high frequency of the T allele of the MTHFR C677T polymorphism and absence of the A / A genotype were observed in the G1691A and G20210A polymorphisms. The investigation concludes that the frequencies of these 5 polymorphisms have a high similarity to the frequencies of South American and Spanish populations, this could possibly be due to miscegenation patterns. The absence of the A / A genotypes could be the result of deleterious alleles. From the results obtained together with the bibliography consulted, it is presumed that the high frequency of the T allele, of the MTHFR C677T polymorphism may be due to a protective role and folate consumption.

ÍNDICE

1. Capítulo I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Objetivo General.....	4
1.4 Objetivos Específicos	4
1.5 Justificación	5
2. Capítulo II. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Trombofilia	6
2.2. Hemostasia.....	8
2.2.1. Fases de la hemostasia.....	8
2.2.1.1. Hemostasia primaria	8
2.2.1.2. Hemostasia secundaria.....	10
2.2.1.3. Hemostasia terciaria	12
2.3. Etiología de la trombosis	13
2.3.1. Factores de riesgo para el padecimiento de trombosis	14
2.4. Historia del ADN	17
2.5. ADN y su estructura.....	17
2.6. Polimorfismos Genéticos.....	18
2.6.1. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).....	19
2.6.2. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) relacionados con la trombofilia	19
2.6.2.1. Factor V de Leiden.....	19
2.6.2.2. Factor II Protrombina	21
2.6.2.3. Metilentetrahidrofolato reductasa	22
2.6.2.4. Inhibidor del activador del plasminógeno-1	23

2.7. Técnicas moleculares.....	24
2.7.1. Extracción de ADN	24
2.7.2. Cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría	25
2.7.3. Reacción de Cadena de la polimerasa	26
2.7.4. PCR Tiempo Real.....	27
2.7.5. Sondas de un solo marcaje (<i>SimpleProbe</i>).....	28
2.8. El equilibrio de Hardy Weimberg.....	29
3. Capítulo III. PROCEDIMIENTOS.....	30
3.1. Población de estudio	30
3.2. Diseño de la investigación.....	31
3.3. Materiales y métodos	31
3.3.1. Diagrama de flujo resumen de la metodología.....	31
3.3.2. Recolección de muestra de sangre periférica	32
3.3.3. Transporte y Almacenamiento	32
3.3.4. Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica.....	33
3.3.5. Cuantificación de ADN genómico	34
3.3.6. PCR en tiempo real	35
3.3.6.1. Determinación del SNP G1691A- SNP G20210A- SNP C677T – SNP A1298C y PAI-1.....	37
3.3.6.2. Determinación de los genotipos de FV-FII-MTHFR-PAI-1	37
3.4. Evaluación estadística de los polimorfismos.....	40
3.4.1. Análisis descriptivo de la población	40
3.4.2. Calculo de las frecuencias alélicas y genotípicas	41
3.4.3. Equilibrio de Hardy Weinberg	41
4. Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1. Extracción de ADN.....	41
4.2. Descripción del grupo de estudio.....	43
4.3. Identificación de genotipos por curvas de disociación	46

4.3.1. Curvas de disociación de los diferentes genotipos del SNP G1691A (rs6025).....	46
4.3.2. Curvas de disociación de los diferentes genotipos del SNP G20210A (s1799963)	47
4.3.3. Curvas de disociación de los diferentes genotipos del SNP C677T (rs1801133)	48
4.3.4. Curvas de disociación de los diferentes genotipos del SNP A1298C (1801131)	50
4.3.5. Curvas de disociación de los diferentes genotipos del SNP 4G/5G (rs1799762).....	52
4.4. Análisis de la frecuencia genotípica y alélicas	54
4.4.1. Distribución genotípica y alélica del SNP G1691A del gen FV.....	54
4.4.2. Distribución genotípica y alélica del SNP G20210A del gen FII	55
4.4.3. Distribución genotípica y alélica del SNP C677T del gen MTHFR	57
4.4.4. Distribución genotípica y alélica del SNP A1298C del gen MTHFR	60
4.4.5. Distribución genotípica y alélica del SNP 4G/5G del gen SERPINE 1.....	61
4.5. Comparación de frecuencias obtenidas con otras poblaciones	63
4.6. Equilibrio de Hardy Weinberg	66
5. Conclusiones y Recomendaciones	68
5.1. Conclusiones.....	68
5.2. Recomendaciones	69
REFERENCIAS	70
ANEXOS	89

1. Capítulo I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La trombofilia se define como un estado de hipercoagulación provocado por una tendencia a formar coágulos en la sangre (Martinelli, Bucciarelli, & Mannucci, 2010). En el siglo XIX, Rudolf Virchow propuso que los mecanismos de la trombosis pueden ser descritos por anomalías en el flujo sanguíneo, anomalías de la sangre y lesión vascular, a estos tres mecanismos se les denominó la triada de Virchow, que hoy se traduce como estado hipercoagulable. A pesar de que la triada de Virchow sigue teniendo validez en la actualidad, la visión más común en medicina moderna es la división de los factores que contribuyen la aparición de la trombosis en dos grupos: hereditarios y adquiridos (Rosendaal, 2005).

Entre factores de riesgo hereditarios se encuentran variaciones genéticas únicas o múltiples (mutaciones y/o polimorfismos genéticos) que afectan a las proteínas implicadas en el sistema hemostático, incrementando el riesgo de padecer trastornos trombóticos. Por otro lado, los factores adquiridos son diversas situaciones como cirugías, terapias de reemplazo hormonal, consumo de medicamentos como acetato de megestrol o anticonceptivos, edad avanzada, períodos de inmovilización prolongados, embarazo, entre otros (Borstnar & López, 2016; Rosing, Hemker, & Tans, 1998).

Entre los defectos hereditarios relacionados con la trombosis, en los que se conoce con más claridad la patogenia de la enfermedad están: factor V de Leiden (G1691A), factor II protrombina (G20210A) y las deficiencias de las proteínas C, S y la antitrombina (AT). Sin embargo, existen otras alteraciones genéticas que codifican para el gen MTHFR y PAI-1, que no han sido estudiadas con mucha claridad, pero se han relacionado con la trombosis, más aún si se encuentran acompañadas de las otras ya mencionadas o entre ellas. La elevada concentración del factor VIII y la homocisteína, que no han sido del todo

caracterizadas ni poseen una determinación genética definida (Álvarez Sala Walther, Casan Clara, Rodríguez De Castro, Rodríguez Hermosa, & Villena Garrido, 2017; Kliegman, Stanton, St Geme, Schor, & Behrman, 2006).

Algunas de las manifestaciones clínicas causadas por los trastornos trombóticos de hipercoagulabilidad primaria son complicaciones tromboembólicas de tipo venoso, siendo la TVP (trombosis venosa profunda) y EP (embolia pulmonar) las que se presentan con mayor frecuencia (Schafer, 2003). Adicionalmente, las trombofilias han sido relacionadas con eventos cardiovasculares adversos, complicaciones en el embarazo, infertilidad, entre otros (Reverter & Vicente, 2016).

Un estudio de la frecuencia del polimorfismo FV, en sujetos de diferentes poblaciones (europeos, subsaharianos, asiáticos, amerindios, africanos y etíopes), sugiere este junto a otros polimorfismos relacionados con la trombosis son más frecuentes en la población europea (Pepe et al., 1997).

Existen algunas investigaciones de la frecuencia de estos polimorfismos en Sudamérica. Por ejemplo, un estudio hecho en Chile en sujetos sanos de etnia mestiza, analizó las frecuencias de algunos polimorfismos que alteraban la cascada de coagulación entre los que estaban FV, FII, MTHFR y PAI-1. Los resultados demostraron que en la población estudiada el genotipo *wild type* para FV y FII era predominante, mientras que genotipo heterocigoto predominó en MTHFR C677T y PAI-1 (Roco et al., 2015).

Otros estudios realizados en población argentina muestran que el mayor porcentaje de la población posee genotipo *wild type* para FV y FII, mientras que la heterocigosidad fue predominante para la MTHFR C677T y PAI-1 (Genoud, Castanon, Annichino-Bizzacchi, Korin, & Kordich, 2000; H. et al., 2008). Una investigación de la frecuencia de estos polimorfismos realizada en población Colombiana mostró un comportamiento muy similar (Torres et al., 2006).

1.2 Planteamiento del problema

La duplicación de la esperanza de vida y una cuadruplicación de la población mundial durante el siglo pasado han provocado que las enfermedades no transmisibles sean hoy en día las principales causas de muerte y discapacidad en todo el mundo, sustituyendo a las enfermedades infecciosas. La enfermedad cardiovascular es uno de los principales contribuyentes a la carga causada por las enfermedades no transmisibles (Hunter & Fineberg, 2014; Lozano et al., 2012).

La trombosis es la patología subyacente más frecuente de los tres trastornos cardiovasculares principales: cardiopatía isquémica (síndrome coronario agudo), accidente cerebrovascular y TEV (tromboembolia venosa). Aproximadamente la mitad de todas las muertes por accidente cerebrovascular fueron por accidentes cerebrovasculares isquémicos son causados por trombosis. En el 2010, se estimó que las afecciones tromboembólicas representaban 1 de cada 4 muertes a nivel mundial (Hunter & Fineberg, 2014; Lozano et al., 2012).

El TEV y la EP constituyen la tercera causa más importante de morbilidad cardiovascular en el mundo occidental después del infarto al miocardio y accidente cerebrovascular. La incidencia de TEV está en un rango aproximado de 100 a 200 por cada 100,000 personas por año. Alrededor de un 30 % de los pacientes con TVP desarrollan EP con síntomas presentes, mientras que un 40% permanecen sin presentar síntomas (Margaglione et al., 2000).

Varios estudios se han enfocado en la evaluación epidemiológica de enfermedades trombóticas en poblaciones europeas y estadounidenses, pero existe información limitada sobre su prevalencia y su carga de morbilidad en América Latina. Existen factores de riesgo que desencadenan en hipercoagulabilidad y son claves para aumentar la incidencia de trombosis, estos incluyen predisposición genética, edad avanzada, períodos de inmovilización

prolongados, cirugías, consumo de anticonceptivos, embarazo, entre otros (Rosing et al., 1998).

Se han reportado polimorfismos en los genes Factor V G1691A, Factor V A4070G, Protrombina G20210A, Protrombina G11991A, PAI-1 4G/5G, Thr312Ala de fibrinógeno alfa, MTHFR C677T, ACE I/D, Factor XIII Val34Leu, β -fibrinogeno 455 G/A, que aumentan el riesgo de padecer trombofilia. Estos estudios han sido realizados en poblaciones caucásicas, chinas (tailandesas) y afroamericanas (Gohil, Peck, & Sharma, 2009).

En Ecuador existen pocos estudios de polimorfismos genéticos, de los cuales la mayoría se enfocan en genes asociados a enfermedades como Cáncer o Alzheimer (Montufar et al., 2017; Paz-y-miNo. 2016; Paz-y-Miño et al., 2010). No se han reportado estudios descriptivos de polimorfismos de genes asociados a enfermedades trombóticas en la población ecuatoriana, según las bases de datos Medline, PubMed, Web of Science, SciELO, Elsevier ScienceDirect, Google Académico, ClinicalKey y Scopus.

1.3 Objetivo General

Determinar las frecuencias de los polimorfismos Factor V de Leiden (G1691A), Factor II Protrombina (G20210A), MTHFR C677T, MTHFR A1298C, y PAI-1 (4G/5G) en una población mestiza residente en el Distrito Metropolitano de Quito.

1.4 Objetivos Específicos

- Describir la población en estudio de acuerdo a datos como edad, sexo, presentación de patologías relacionadas con eventos trombóticos, antecedentes familiares asociados con eventos trombóticos y consumo de anticoagulantes obtenidos a partir del formulario de toma de muestras.

- Identificar los polimorfismos de los genes de Factor V de Leiden (G1691A), Factor II Protrombina (G20210A), MTHFR C677T, MTHFR A1298C, y PAI-1 (4G/5G) y describir sus frecuencias genotípicas y alélicas en la población mestizo-ecuatoriana del Distrito Metropolitano de Quito, a través de la técnica de PCR Tiempo Real.
- Comparar las frecuencias obtenidas con las de otras poblaciones.

1.5 Justificación

La frecuencia de polimorfismos en una población arroja datos epidemiológicos de gran importancia ya que describen la incidencia e historia de la enfermedad de interés. Además ayudan a encontrar asociaciones entre los supuestos factores de riesgo y los efectos en la salud de una población (Wilbert & McClung, 2016, pp. 215-211).

De acuerdo al meta-análisis realizado por Gohil y colaboradores, en una población de 126,525 casos y 184,068 controles derivados de 173 estudios caso-control, en comparación con los polimorfismos de tipo salvaje el riesgo de padecer de tromboembolismo venoso (TEV) aumenta hasta 9,45 veces en heterocigotos de Factor V de Leiden, 3,17 veces en heterocigotos de Factor II Protrombina y 1,62 veces en heterocigotos de PAI-1 en poblaciones caucásicas, Por otro lado, en poblaciones tailandesas se reportó un incremento en el riesgo de TEV de hasta 1,57 veces para portadores del genotipo heterocigoto del gen MTHFR C677T (Gohil et al., 2009). Es por ello, que conocer los genes relacionados con patologías como la trombosis en una población determinada es de gran utilidad en el pronóstico precoz y su manejo, no solo en los individuos portadores sino en su descendencia.

Debido a que algunos genes relacionados con la trombosis son de carácter autosómico dominante (muestran una transmisión vertical y afecta a ambos sexos por igual), constituyen un factor de riesgo hereditario importante para el

padecimiento de la trombofilia en familiares de primer grado. Por esta razón este tipo de estudio puede explicar la heredabilidad de enfermedades complejas y las posibles interacciones entre los efectos genéticos y ambientales en la progenie, (Hopper, Bishop, & Easton, 2005, pp. 1397-1406).

Por otro lado, la evidencia de varios estudios llevados a cabo en diversos estados de Estados Unidos demostró que existen diferencias en la incidencia de TEV entre poblaciones caucásicas, afroamericanas, hispanas y asiáticas, por lo que no es conveniente realizar una extrapolación de la prevalencia de dichas enfermedades a partir de datos adquiridos de otras poblaciones (While, 2003; White & Keenan, 2009). Las pruebas genéticas se han convertido en el estándar para determinar los polimorfismos genéticos asociados a las trombofilias, y por tanto permiten conocer si existe un riesgo aumentado de padecer esta condición (Lane & Grant, 2000).

A través de este estudio se obtendrán datos poblacionales de los polimorfismos Factor V de Leiden (G1691A), Factor II Protrombina (G20210A), MTHFR C677T, MTHFR A1298C, y PAI-1 (4G/5G) de la población mestizo-ecuatoriana. Al ser estas variantes vinculadas con las trombofilias, los datos obtenidos permitirán conocer la prevalencia de factores de riesgo genéticos y por tanto contribuirán a la prevención de enfermedades trombóticas. Con ello también se podrá tomar medidas de salud enfocadas en la reducción o mitigación de su incidencia, además de controlar impactos de índole económico, laboral, social y psicológico relacionados con estas enfermedades.

2. Capítulo II. MARCO TEÓRICO

2.1. Trombofilia

El término trombofilia es acuñado por primera vez en 1937 como un término antónimo de la hemofilia (MONTÓ, 1952). La trombofilia, se define como un

estado patológico que conduce a la trombosis (hipercoagulación provocada por una tendencia a formar trombos en la sangre) (Martinelli et al., 2010).

Un trombo, es formado por una malla que contiene proporciones variables de fibrina, plaquetas, glóbulos blancos y rojos. Cuando el trombo se encuentra en vena se denomina *trombosis venosa*, y si éste se aloja en arteria se denomina *trombosis arterial* (Figura 1). También existe la posibilidad de que este se encuentre en capilares y el corazón (Cruz & Espinosa, 2007).

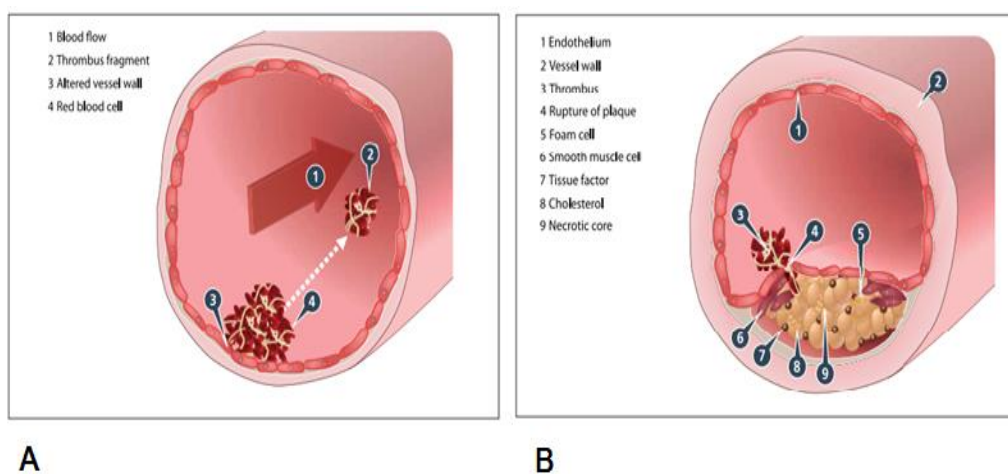


Figura 1. Tipos de trombosis.

Tomado de: (Turpie & Esmon, 2011).

A) Trombosis Venosa

B) Trombosis Arterial

Cuando el trombo se desprende completamente o parcialmente se llama *émbolo* y si éste migra a través de la circulación se denomina *embolia*. La trombosis es la patología subyacente más común de: infarto al miocardio, infartos cerebrales, TVP y EP, cuando estas dos últimas se encuentran en conjunto se las denomina TEV (tromboembolia venosa), entre otros (International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2017).

2.2. Hemostasia

La hemostasia se puede definir como el conjunto de mecanismos fisiológicos que mantienen el control y equilibrio de la sangre, para que la misma mantenga su fluidez dentro de los vasos sanguíneos, si existe lesiones en los mismos, ésta es la encargada de la reparación (Jesús & Fermín, 2015, pp. 201-2014). Es así que cuando existe un daño a nivel vascular, nuestro organismo coagula la sangre para controlar el exceso de sangrado en el área lesionada, y una vez que el daño ha sido reparado, los coágulos son lisados por el sistema fibrinolítico para que finalmente el flujo sanguíneo normal se restaure (Pardo & Miller, 2018, pp. 377-394).

Cuando la coagulación es deficiente se produce una hemorragia y por el contrario si la coagulación es excesiva se producen complicaciones trombóticas, ya sea por la disfunción o un desequilibrio en los componentes hemostáticos. Los principales componentes que actúan en el proceso hemostático son: las paredes vasculares, plaquetas, proteínas de coagulación, proteínas anticoagulantes y el sistema fibrinolítico (Kliegman, Stanton, Geme, Schor, & Behrman, 2016; Pardo & Miller, 2018).

2.2.1. Fases de la hemostasia

2.2.1.1. Hemostasia primaria

La hemostasia primaria, comienza cuando hay una lesión endotelial vascular, provocando una vasoconstricción modulada por mediadores de las células endoteliales (como la endotelina) y plaquetas, esto con el fin de reducir el flujo sanguíneo en el área afectada y favorecer el inicio de la formación del coágulo (Figura 2) (Kumar, Abbas, & Aster, 2015; Rozman Borstnar & Cardellach López, 2016a).

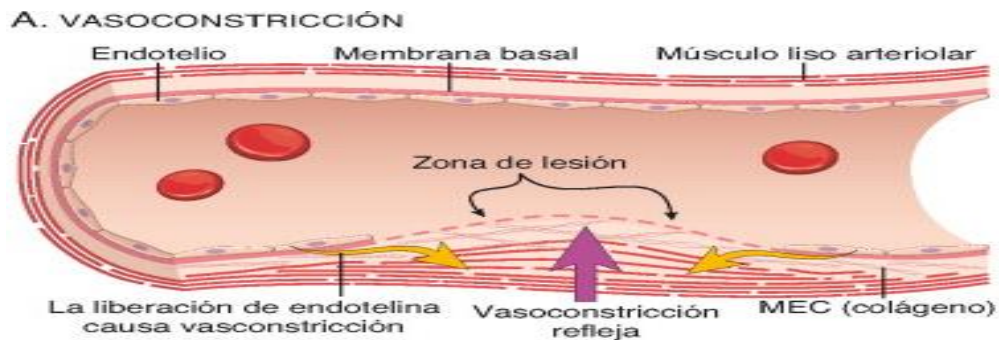


Figura 2. Vasoconstricción y sus elementos tras una lesión vascular.

Tomado de: (Kumar et al., 2015, pp. 113-135).

A continuación se produce la formación del trombo o tapón plaquetario. Este se forma cuando las plaquetas entran en contacto con componentes del tejido subendotelial como el factor von Willerbrand (vWF), colágeno, fibrinógeno, fibronectina y vitronectina en presencia de Ca^{2+} . A esta unión se la denomina *adhesión plaquetaria*, y se da gracias a dos receptores principales: integrina $\alpha 2\beta 1$ y glicoproteína (GP) VI. Después de la unión de las plaquetas con el colágeno subendotelial, se desencadena la activación de las plaquetas. A partir de los gránulos densos y alfa de las plaquetas, sustancias como el tromboxano, ADP, ATP, serotonina, proteínas adhesivas, Ca^{2+} , factores de coagulación y factores de crecimiento son liberados. Dichas sustancias fortifican las interacciones entre las plaquetas adherentes y promueven el reclutamiento de plaquetas adicionales circulantes para el fortalecimiento del trombo plaquetario (Davis & Cladis, 2017, pp. 1142-1168; Reverter & Vicente, 2016, pp. 1691,1719). La hemostasia primaria se puede apreciar en la Figura 3.

B. HEMOSTASIA PRIMARIA

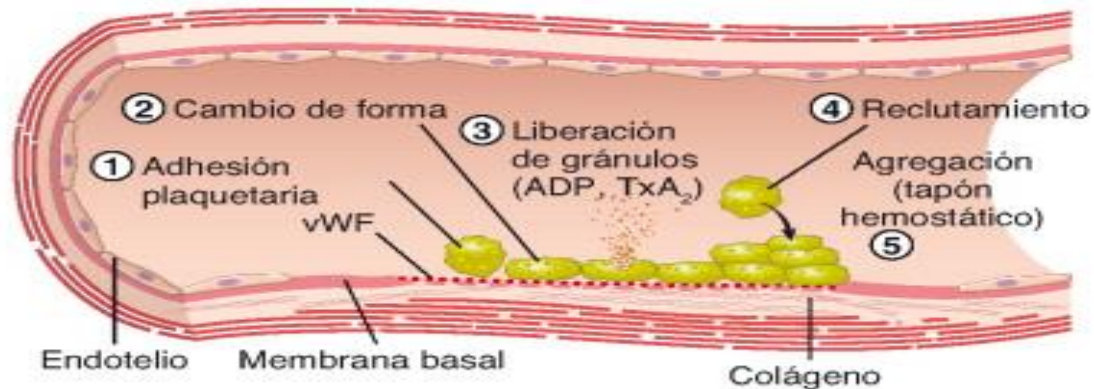


Figura 3. Representación gráfica de la hemostasia primaria.

Tomado de : (Kumar et al., 2015, pp. 113-135).

2.2.1.2. Hemostasia secundaria

Aquí se da la cascada de coagulación y la propagación del coágulo. La finalidad de la hemostasia secundaria es la producción de trombina y la formación de un coágulo de fibrina, gracias a la agregación plaquetaria junto con la activación de factores de coagulación (Tabla 1) (Davis & Cladis, 2017, pp. 1142-1168). Tradicionalmente la cascada de coagulación fue definida por el “modelo de cascada” descrito por vías intrínsecas, extrínsecas y comunes. La vista actual de la cascada de coagulación es que después de la formación del tapón plaquetario la coagulación se da a través de la interacción de los siguientes mecanismos: activación del FT (factor tisular) de los factores de coagulación, y la amplificación de estos, seguido de la propagación de la formación de coágulos por trombina (Berndt, Metharom, & Andrews, 2014).

Este evento inicia en el sitio de lesión tisular donde el FT interactúa con el factor VIIa (factor VII activado), formando el complejo (TF-VIIa). Este complejo activa los factores X y IX. Una vez el factor X es activado (Xa), éste activa al factor V (el cual fue liberado en la hemostasia primaria por los gránulos plaquetarios) y a su vez forma un complejo con el mismo denominado *protrombinasa*. Dicho complejo convierte una pequeña cantidad de FII (protrombina) en trombina. Esta

pequeña cantidad de trombina da paso a la activación de las plaquetas y los factores V, VIII, XI. En la superficie de las plaquetas activadas, los factores IXa y VIIIa forman un complejo denominado “complejo *de tenasa*”, que activa gran cantidad de factor X, favoreciendo a la producción de trombina. Una vez que se tiene cantidades suficientes de trombina, la fibrina es generada a partir del fibrinógeno para formar el coagulo (Davis & Cladis, 2017, pp. 1142-1168). En la Figura 4, se puede apreciar la hemostasia secundaria.

Tabla 1.

Factores de coagulación plasmática y su denominación

FACTOR	DENOMINACIÓN
Factor I	Fibrinógeno
Factor II	Protrombina
Factor V	Proacelerina
Factor VII	Proconvertina
Factor VIII	Factor antihemofílico A
Factor Von Willebrand (vW)	Factor Von Willebrand
Factor IX	Factor Christmas, Factor de hemofilia B
Factor X	Factor Stuart
Factor XI	Antecedente tromboplastínico, Factor de hemofilia C
Factor XII	Factor Hageman
Factor XIII	Factor estabilizante de la fibrina

Tomado de: Reverter & Vicente (2016).

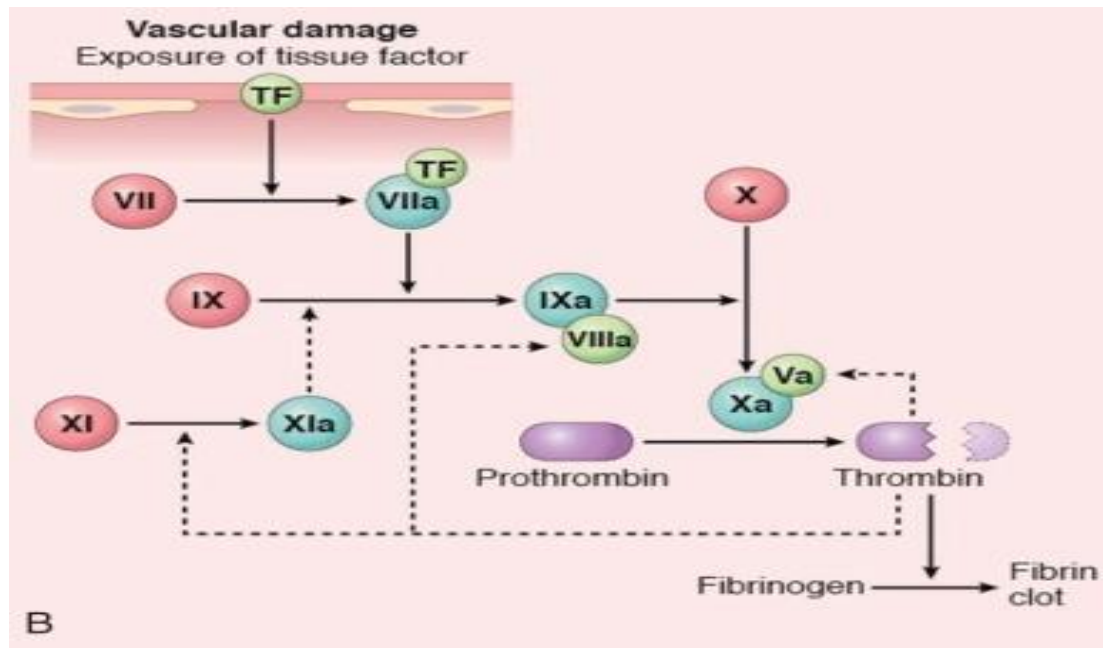


Figura 4. Pasos y factores que intervienen en la Hemostasia secundaria.

Tomado de: Kumar et al. (2015, pp. 113-135).

Inmediatamente después de la formación de trombina, se genera la activación de los inhibidores de la coagulación como: la antitrombina (AT), el inhibidor de la vía del factor tisular (TPFI) y proteína C activada (PCa) (Reverter & Vicente, 2016).

2.2.1.3. Hemostasia terciaria

A esta hemostasia también se la conoce como fibrinólisis y es de gran importancia porque mantiene y regula la permeabilidad del sistema vascular. En este proceso se destruye la fibrina formada durante la coagulación mediante la enzima plasmina. Ésta se activa a partir de su forma de zimógeno (precursor enzimático inactivo) denominado plasminógeno (la plasmina activa está controlada por factores contrarreguladores como el inhibidor de α_2 -plasmina), estos sucesos se dan gracias a la acción del activador tisular del plasminógeno (t-PA). El tPA solo activa el plasminógeno que está unido a la fibrina limitando la fibrinólisis a la zona de formación de coágulos. El principal inhibidor de dicho proceso es inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1). Por lo tanto, la

homeóstasis de la lisis de coágulo o trombo, se da por el equilibrio entre tPA y PAI-1 (Colwell, 2004). El proceso de fibrinólisis se puede apreciar en la Figura 5.

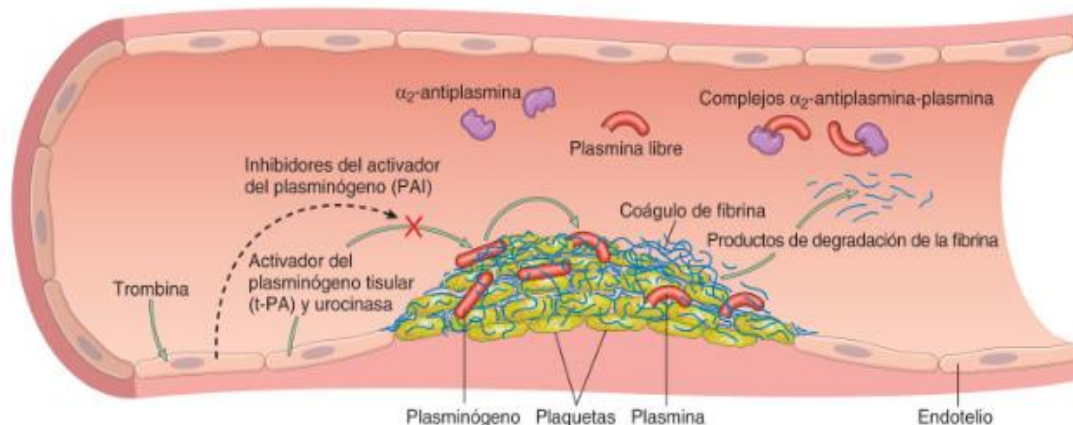


Figura 5. Proceso de fibrinólisis con sus activadores e inhibidores de PAI-1.

Tomado de: Kumar et al. (2015, pp. 113-135).

Cuando existen alteraciones en el proceso de la hemostasia las plaquetas, los factores de coagulación procoagulantes, las proteínas anticoagulantes, y otros elementos pueden alterarse y desequilibrar el sistema hemostático provocando el exceso de sangrado o coagulación. La deficiencia congénita de una proteína procoagulante individual puede dar paso a un trastorno hemorrágico. Por otro lado, la deficiencia de un anticoagulante (inhibidor del factor de coagulación) o el aumento de la actividad procoagulante puede dar paso a la trombosis (Kliegman et al., 2019, pp. 2589-2594).

2.3. Etiología de la trombosis

En la actualidad, se sigue tomando en cuenta la tríada de Virchow para explicar la etiología de la enfermedad (Andrew, 1995). Se sabe que la interacción de los factores de esta tríada condicionan el apareamiento de la trombosis, debido a esto es considerada una enfermedad con origen multifactorial (genes y ambiente) (Rozman Borstnar & Cardellach López, 2016^a, pp. 1203-1205).

2.3.1. Factores de riesgo para el padecimiento de trombosis

Los factores de riesgo de origen genético, es decir los estados tromboticos congénitos se dividen en dos grupos claros. El primer grupo catalogado como de “pérdida de inhibición” constituye defectos asociados con los niveles reducidos de anticoagulantes naturales como la antitrombina, la proteína C y la proteína S. Estos son poco comunes, pero están asociados a un mayor riesgo de apareamiento de la trombosis (Crowther & Kelton, 2003).

El otro grupo es categorizado de “ganancia de función procoagulante”, debido a que provocan el aumento de la función en los niveles de los factores de coagulación como: mutaciones en FV, FII, aumento en los factores de coagulación VIII, IX y XI, y las disfibrinogenemias. Estos provocan un riesgo bajo en la aparición de la trombosis comparado al otro grupo, pero se encuentran con más frecuencia en la población, por ende son asociados con la trombosis clínica. Además, existen otras mutaciones, en el gen MTHFR provocando una reducción de 50 % en la actividad enzimática de dicho gen y en el gen SERPINE1 que provoca el mal funcionamiento en la proteína PAI-1 causando alteraciones en la fibrinólisis. Estas mutaciones también se han asociado con el apareamiento de trombosis (Crowther & Kelton, 2003) .

Estudios demuestran que en la mayoría de casos, los individuos que heredan más de una anomalía genética, tienen un riesgo significativamente mayor de padecer trombosis (Sidawy & Perler, 2018, pp. 484-496; Sverre,C., Suzanne,C., Ted., Jan,P., & Frits,R., 2005).

Tabla 2.

Factores de riesgos congénitos y adquiridos para el padecimiento de trombosis

FACTORES DE RIESGO PARA EL PADECIMIENTO DE TROMBOSIS	
CONGÉNITOS	ADQUIRIDOS
Asociación confirmada	Edad
Factor V de Leiden	Cirugías
Protrombina G20210A	Inmovilización
Proteínas C y S (deficiencia y moléculas disfuncionales)	Embarazos
Defectos de antitrombina (deficiencia y moléculas disfuncionales)	Cáncer
Disfibrinogenemia (muy rara)	Obesidad
Hiperhomocisteinemia(MTHFRC677T/A1298T)	Anticonceptivos orales
Niveles elevados de factor VII (antecedentes genéticos para ser confirmado)	
Asociación aún bajo investigación	
Niveles elevados de IX y XI	
Deficiencia del plasminógeno	
Disminución de la fibrinólisis	
Mutaciones de trombomodulina	
Activador del plasminógeno tisular	
Aumento de lipoproteína a	
Inhibidor del Plasminógeno 1 (PAI-1)	
Cofactor de heparina II	
Mutaciones en el gen receptor de la proteína C endotelial	

Adaptado de: Khan & Dickerman (2006), Martinelli et al. (2010) y Simioni et al. (2006).

Por otro lado, están los factores de riesgos ambientales, que son el resultado de una variedad de anomalías adquiridas como es el caso del embarazo, cáncer,

anticonceptivos, cirugías entre otros (Sidawy & Perler, 2018, pp. 484-496). En la Tabla 2, se ilustra los factores de riesgos para el padecimiento de la trombosis, tanto congénitos como adquiridos.

Existen algunos paneles genéticos que ayudan a encontrar algunas alteraciones en el ADN implicadas con la trombosis hereditaria. Sin embargo, los genes interactúan con el ambiente y se tienen que evaluar también otros factores que conllevan a la aparición de la trombosis como cáncer o síndrome antifosfolipídico para dar un diagnóstico más certero. Estos paneles genéticos, son de gran utilidad para la predicción de riesgo de recurrencia de la trombosis y la detección de algún gen en familiares del paciente, aun si estos son asintomáticos (Simioni et al., 2006; Tormene et al., 2002).

A pesar que los pacientes con trombosis sean identificados como portadores de algún polimorfismo genético relacionado con la enfermedad (FV de Leiden, Protrombina (FII), entre otros), no existen estudios disponibles que comparen diferentes estrategias de profilaxis en diversas situaciones de riesgo (Simioni et al., 2006). En la Tabla 3, se muestra un panel de pruebas que posiblemente se pueden realizar para la evaluación de la trombofilia hereditaria.

Las pruebas que se deben realizar se verán influenciadas, por factores como: la disponibilidad de tecnología, las preferencias personales, entre otros.

Tabla 3.

Posible panel de pruebas para la detección de trombofilia hereditaria

MEDICIÓN	PRUEBA
Actividad de antitrombina	Prueba cromogénica
Actividad de proteína C	Actividad cromogénica y/o anticoagulante
Actividad de proteína S	Pruebas con antígenos
Resistencia de proteína C activada	Prueba de resistencia a la proteína C activada

Factor V de Leiden	Análisis de ADN
FII Protrombina	Análisis de ADN
Homocisteinemia	Ensayo de homocisteina en plasma

Adaptado de: Simioni et al. (2006)

2.4. Historia del ADN

En la antigüedad no se tenía claro el concepto de ADN, muchos científicos creían que el ADN era una molécula simple con muchas repeticiones de ácidos nucleicos. La primera descripción sin saber aún el concepto de esta molécula comenzó en 1869, por Friedrich Miescher, cuando aisló material hereditario (Dahm, 2005).

Desde entonces varios catedráticos intentaron dilucidar el concepto de ADN, Fred Griffith, en 1928 trabajó con dos cepas de *Streptococcus*, dándose cuenta que las características de una cepa podrían otorgarse a la otra a lo que nombro el principio transformador. En 1944, Oswald Avery, Maclyn McCarty y Colin MacLeod al trabajar con *Streptococcus pneumoniae* desmintieron la creencia de que el ADN era una proteína e identificaron al mismo como material genético (Avery, Colin M, & McCarty, 1944) . Sin embargo, no es hasta 1953, cuando Watson y Francis Crick descubren la doble hélice del ADN gracias a las imágenes de difracción de rayos X producidas unos años antes por Rosalind Frankland, que se clarificó el concepto de la molécula de la vida el ADN (Watson & Crick, 1953). El modelo de doble hélice del ADN, propuesto por estos autores se aprecia en la Figura 6.

2.5. ADN y su estructura

Gracias a la genética básica, se sabe que las moléculas de ácido nucleico están empaquetadas en estructuras denominadas genes. Existen dos tipos de ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) (presente en la mayoría de virus) (Hoagland, 1959, pp. 55-61).

El ADN es un polímero lineal conformado por subunidades denominadas nucleótidos. Cada uno de estos posee un resto de azúcar de cinco carbonos denominada desoxirribosa, un grupo fosfato unido a esta azúcar en la posición 5' del carbono y una base nitrogenada unida en la posición 1' (existen cuatro alternativas : adenina (A), guanina (G), citosina (C), Timina (T), se cambia la timina por uracilo (U) en el caso de ARN) (Hoagland, 1959).

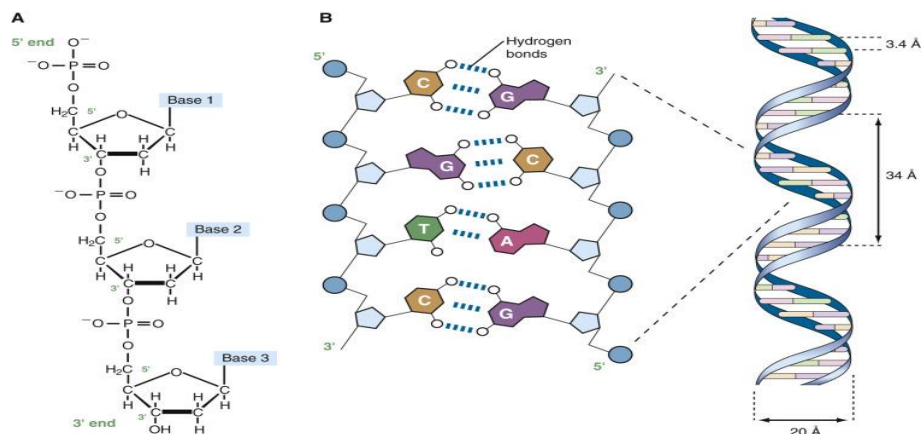


Figura 6. Estructura de ADN.

Tomado de: Nussbaum, McInnes, & Willard (2016b, pp. 3-20).

- A) Porción de una cadena de polinucleótido de ADN, que muestra los enlaces fosfodiéster 3'-5' que enlazan nucleótidos adyacentes.
- B) Modelo de doble hélice del ADN según lo propuesto por Watson y Crick.

2.6. Polimorfismos Genéticos

El sitio identificable en un genoma, generalmente en un gen, se llama locus y cualquier variante en dicho sitio se denomina alelo. Cuando una persona tiene alelos idénticos en un mismo locus es homocigota en ese sitio. Mientras que una persona con dos alelos diferentes es considerada heterocigótica. Los polimorfismos genéticos son variaciones que ocurren en el genoma de algunos individuos y que se transmiten a la descendencia, adquiriendo cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Para considerarse un polimorfismo,

la frecuencia de uno de sus alelos en la población debe ser de al menos 1% (Daiger et al., 2013, pp. 624-634).

2.6.1. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

Un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) es la variación en la secuencia de ADN de una sola base nitrogenada y por lo general son bialélicos. Los polimorfismos de un solo nucleótido constituyen una de las principales causas de la variabilidad genética e influyen en la susceptibilidad de padecer diversas enfermedades como: Alzheimer, cáncer, trombosis, entre otras. Debido a que pueden interferir en la función o expresión de un gen. Sin embargo hay otros que otorgan resistencia a enfermedades como al VIH (Cross, 2019, pp. 27-52).

La mayoría de estas variaciones genéticas pueden encontrarse en todas las poblaciones humanas, aunque algunas variantes pueden ser específicas de una población determinada o específicas de origen (Gleason & Juul, 2019, pp. 180-189).

2.6.2. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) relacionados con la trombofilia

2.6.2.1. Factor V de Leiden

El Factor V es una glicoproteína de cadena única sintetizada en el hígado que interviene en la cascada de coagulación y es controlada por la proteína C activada (APC). La proteína de Factor V es codificada por un gen con su mismo nombre que posee 25 exones (Cripe, Moore, & Kane, 1992). Dicho gen se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 1, posición 24,2 (1q24,2) (National Center for Biotechnology Information, 2018a). La variación más común del Factor V ocurre por el cambio de una guanina por adenina en el nucleótido 1691(c,1691g>A), resultando en el Factor V de Leiden (Kalafatis, Rand, & Mann, 1994). Esta mutación da lugar a la síntesis de una molécula de Factor V con un

residuo de glutamina en lugar de un residuo de arginina en la posición 506 (p,Arg506Gln) lo que provoca que el Factor V mutado adquiera resistencia a la APC. La APC es un anticoagulante natural que escinde e inactiva los factores procoagulantes Va y VIIIa, regulando negativamente la generación adicional de trombina, por lo que la resistencia a la APC provoca una pobre respuesta anticoagulante (Dahlbäck, 2008).

La resistencia a la APC mantiene al Factor V activo durante la circulación por más tiempo de lo normal, provocando mayor generación de fibrina y una tasa de inactivación hasta 10 veces más lenta de lo normal (R. Bertina, Koeleman, & Koster, 1995; Voorberg et al., 1994). La forma de herencia del Factor V de Leiden es autosómica dominante, de tal forma que la presencia de esta mutación aumenta el riesgo de padecer tromboembolia venosa de tres a cinco veces más en individuos heterocigotos y hasta 80 más en homocigotos en poblaciones caucásicas (R. Bertina et al., 1995).

El Factor V Leiden es la forma hereditaria más común de trombofilia. Entre 3-8% de las poblaciones caucásicas de Estados Unidos y europeas llevan una copia de la mutación del Factor V Leiden, y aproximadamente 1 de cada 5,000 individuos caucásicos tiene dos copias de la mutación (National Human Genome Research Institute, 2011). Sin embargo, la frecuencia de esta mutación es menor en poblaciones hispanas, africanas y casi inexistente en poblaciones asiáticas (Douglas, Zipes, Libby, & Bonow, 2015). Es así que un estudio epidemiológico realizado en 4,047 individuos en Estados Unidos, concluyó que la incidencia de la forma heterocigota del Factor V de Leiden en caucásicos estadounidenses fue de 5,27 %, en hispano americanos 1,23 %, en afroamericanos 1,25 % , en indios americanos 1,25 % y en asiáticos solo un 0,45 % (Ridker, Miletich, Hennekens, & Buring, 1997).

2.6.2.2. Factor II Protrombina

La protrombina (factor de coagulación II) es el precursor de la trombina que participa como serina proteasa (factor II) en la cascada de coagulación (R. M. Bertina, van Tilburg, de Fouw, & Haverkate, 1992; Dang, Vindigni, & Di Cera, 1995). La enzima trombina juega un papel esencial en el proceso de hemostasia ya que convierte el fibrinógeno en fibrina para la formación de coágulos sanguíneos, estimula la agregación plaquetaria y activa los factores de coagulación V, VIII y XIII. Además, la trombina inhibe la coagulación mediante la activación de la proteína C (Esmon, 2000; Isetti & Maurer, 2007; Segers et al., 2007).

El gen que codifica para la protrombina tiene un tamaño aproximado de 21 kb y posee 14 exones. Este gen está localizado en el brazo corto del cromosoma 11, posición 11,2 (11p11,2) (Orkin et al., n.d.; Royle, Irwin, Koschinsky, Macgillivray, & Hamerton, 1987). La mutación más frecuente de este gen ocurre por un cambio de guanina por adenina en el nucleótido 20210 (c,20210G>A) de la región 3' no codificante del gen. Esta mutación está asociada a un aumento de los niveles de protrombina en plasma, lo que a su vez incrementa el riesgo de TEV (Valtueña, M, Ara, & R, 2007). La forma de herencia del Factor II G20210A es autosómica dominante y el riesgo de trombosis es más elevado para aquellas personas que poseen dos copias del gen mutante (homocigotos), que para aquellas que solo poseen una (heterocigotos) (Wahed & Dasgupta, 2015). Además esta mutación está relacionada con pérdidas fetales tempranas y tardías (Schwartz, 2018).

Las mutaciones heterocigotas de protrombina se encuentran en aproximadamente el 2 % de la población caucásica de Estados Unidos. Esta mutación presenta bajas frecuencias en poblaciones afroamericanas (aproximadamente 0,5 %) y es incluso menos frecuente en poblaciones asiáticas, africanas y nativo-americanas. Por otro lado, la forma homocigota es considerada rara con una ocurrencia aproximada de 1 en 10,000 individuos (Varga & Moll, 2004).

2.6.2.3. Metilentetrahidrofolato reductasa

La metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una enzima que juega un importante papel en el procesamiento de aminoácidos. Esta cataliza una reacción química que involucra formas de la vitamina folato (también llamada vitamina B9), específicamente convierte la molécula 5,10-metilentetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato. Esta reacción es necesaria en el proceso de conversión del aminoácido homocisteína en metionina, la cual es usada por el cuerpo para producir proteínas y otros compuestos importantes (Genetics Home Reference, 2018b). La deficiencia de MTHFR se asocia con hiperhomocisteinemia (elevados niveles de homocisteína en la sangre), que a su vez constituye un factor de riesgo de trastornos trombóticos, incluyendo TVP y EP (Almawi, Ameen, Tamim, Finan, & Irani-Hakime, 2004; Moll & Varga, 2015; Sofi et al., 2005).

El gen que sintetiza la MTHFR está localizado en el brazo corto del cromosoma 1, posición 36,22 (1p36,22) (National Center for Biotechnology Information, 2018b). Se han reportado varias mutaciones dentro de este gen. La mejor caracterizada es el polimorfismo C677T, el cual provoca la reducción de la termoestabilidad de la enzima MTHFR y por tanto reduce su actividad (Brustolin, Giugliani, & Félix, 2010). Este polimorfismo consiste en un cambio de citosina por timina en el nucleótido 677 que a su vez resulta en una sustitución de valina por alanina en el aminoácido 226. Cuando los niveles de folato son bajos, esta sustitución se ha relacionado con un riesgo de hiperhomocisteinemia moderada en individuos homocigotos (T/T) en comparación con heterocigotos o no portadores (Almawi et al., 2004; Friedman et al., 1999).

Se ha reportado otro polimorfismo denominado A1298C que al parecer también provoca una reducción en la actividad de la enzima MTHFR y ocurre por el cambio de una adenina por una citosina en el nucleótido 1298, localizado en el dominio regulador de la enzima (Friedman et al., 1999; Van Der Put et al., 1998). A diferencia del C677T encontrado dentro del dominio catalítico enzimático, el polimorfismo A1298C no da como resultado una proteína termolábil o con

homocisteína incrementada (Friso et al., 2002; Hanson, Aras, Yang, & Tsai, 2001). A pesar de que, la forma homocigota como heterocigota de este polimorfismo no se asocian a un aumento de homocisteína o disminución de la concentración plasmática de folato, su heterocigosidad combinada con C677T parece provocar un efecto similar al de la homocigosidad C677T (Chango et al., 2000; Abalo Chango et al., 2005).

La frecuencia de estos dos polimorfismos varía según su origen geográfico. Se ha visto que existe una prevalencia de estos dos polimorfismos de aproximadamente 25-45 %, en poblaciones caucásicas, asiáticas, e hispanas, mientras que en poblaciones africanas esta prevalencia es mucho menor (Inoue, 2007; Lecumberri & Rodríguez, 2018).

2.6.2.4. Inhibidor del activador del plasminógeno-1

El inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) es una glicoproteína necesaria para la coagulación sanguínea normal (hemostasia). Promueve la fibrinólisis inhibiendo a los activadores del plasminógeno. Lo cual garantiza que los coágulos permanezcan intactos hasta que dejen de ser necesarios para detener el sangrado (Genetics Home Reference, 2018a). Elevados niveles de PAI-1 en la sangre han sido asociados con un mayor riesgo de trombosis arterial debido a la inhibición de la fibrinólisis (Francis, 2002).

El PAI-1 consiste en una glicoproteína monocatenaria con un peso molecular de 47,000 Da y 379 aminoácidos (Nordhem & Wiman, 1997). El gen que codifica al PAI-1 se denomina SERPINE1 y está localizado en el brazo largo del cromosoma 7 posición 22,1 (7q22,1) (National Center for Biotechnology Information, 2018c). Los genotipos posibles que ocurren a causa de un cambio de cinco guaninas (5G) consecutivas a cuatro guaninas (4G) en la posición -675 pb son tres: 4G/4G, 4G/5G, 5G/5G, siendo los individuos 4G/4G quienes presentan los niveles plasmáticos más elevados de PAI-1 (Huber, Christ, Wojta, & Gulba, 2001; Margaglione et al., 1998).

2.7. Técnicas moleculares

La biología molecular es una rama relativamente nueva de la biología que aplica técnicas más sensibles de laboratorio. Las pruebas para el diagnóstico (pruebas de diagnóstico molecular) pueden ir enfocadas al diagnóstico clínico e implican la detección de moléculas específicas como: ADN, anticuerpos, proteínas, entre otras para la detección de enfermedades infecciosas, hereditarias, oncología, predisposición de enfermedades o la descripción de polimorfismos relacionados con estados patológicos (Biswas, 2016).

2.7.1. Extracción de ADN

Es posible obtener ADN a partir de cualquier célula nucleada del cuerpo por ejemplo: muestra sanguínea, tisular, lavados bucales, raíces capilares, material parafinado, entre otras. Pero debido a su alto rendimiento y su sencilla extracción, la fuente más común de ADN genómico son los leucocitos obtenidos de sangre periférica (Rozman Borstnar & Cardellach López, 2016b, pp. 1130-1138)

Hoy en día existen muchos métodos que permiten la extracción y purificación de ADN, entre ellos están: extracción orgánica (con fenol y cloroformo), extracción por Chelex (resina quelante), extracción mediante kits comerciales, equipos automatizados de extracción de ADN. Sin embargo los más utilizados en laboratorios para diagnóstico clínicos son las extracción mediante kits comerciales y equipos automatizados de extracción de ADN, gracias a la obtención de ADN en pocas horas (Villanueva Cañadas, 2019, pp. 1365-1370).

Los pasos básicos de la extracción de ADN son: lisis celular, degradación de la fracción proteica al ADN y purificación (precipitación-lavado-recuperación). En los kits comerciales, se eliminan las proteínas que se encuentran unidas al ADN mediante columnas de afinidad que se unen selectivamente a través de proteasas y tampones caotrópicos. Cuando se produce la unión a las columnas,

estas son lavadas para eliminar residuos celulares mediante sales de enjuague (Vulliamy, Kaeda, & Bain, 2008, pp. 477-509). En la Figura 7, se puede apreciar la representación gráfica de extracción de ADN mediante Kit comercial a partir de sangre.

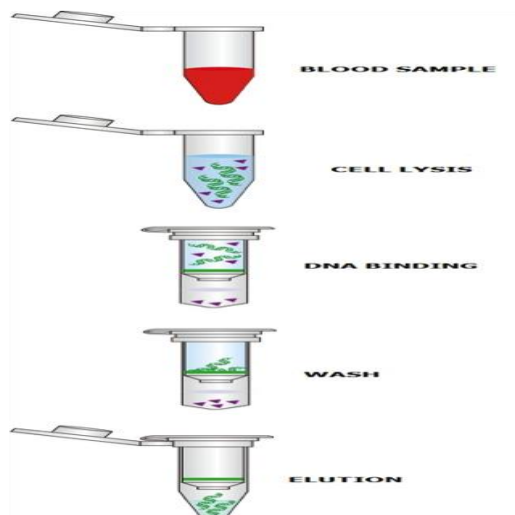


Figura 7. Representación gráfica de extracción de ADN mediante Kit comercial a partir de sangre.

Tomado de: Duviz (2019).

2.7.2. Cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría

Antes de proceder al análisis del ADN, es necesario saber su valor cuantitativo y cualitativo, para lo cual existen varios métodos de cuantificación como: Slot Blot, electroforesis en geles de agarosa, espectrofotometría, entre otros (Villanueva Cañadas, 2019, pp. 1365-1370).

La espectrofotometría de absorción ha proporcionado un medio para utilizar métodos cuantitativos y cualitativos para medir analitos en fluidos corporales. La espectrofotometría ultravioleta-visible es una técnica utilizada para la evaluación de la calidad y cantidad de ADN mediante la medición de la densidad óptica (OD). La medición se hace en dos longitudes de onda específicas para ácidos nucleicos y proteínas respectivamente: 260 y 280 nm. Este principio se basa en la capacidad que tienen los compuestos de absorber energía, debido a que los

ácidos nucleicos absorben luz uv, por la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de su cadena y a su vez la cantidad de luz absorbida depende de la forma lineal de la concentración (Shukla, 2013, pp. 251-267).

2.7.3. Reacción de Cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR fue desarrollada por primera vez por Kary Mullis en 1983 (Mullis, 1990). Desde entonces esta técnica ha simplificado muchos procedimientos en el campo de la biología molecular y ha hecho posible la creación y mejoramiento de nuevas técnicas (Carson, Miller, & Witherow, 2012).

Esta técnica tiene como objetivo obtener varias copias de un fragmento de ADN, mediante amplificación del mismo, imitando la replicación *in vivo*. En este procedimiento actúa una enzima termoestable denominada *Taq polimerasa*, la cual sintetiza la cadena complementaria de un ADN molde *in vitro*. Para que pueda comenzar la síntesis es necesario un fragmento de ADN de doble cadena, dicha secuencia es generada mediante el alineamiento de un oligonucleótido (cadena que contiene de 19 a 25 pb) a un molde de ADN de cadena única. Dichos oligonucleótidos son sintetizados *in vitro* y son conocidos como cebadores o *primers*. En la PCR, se hace uso de dos cebadores que franquean la secuencia a amplificar, uno en sentido 5' - 3' y otro en sentido 3' - 5' (Vulliamy et al., 2008, pp. 477-509).

La PCR, consta de tres etapas:

- Desnaturalización: se denatura el ADN para generar moldes monocatenarios. Este proceso se lleva a cabo a 95 °C, temperatura requerida para que se dé la ruptura de los puentes de hidrógeno.

- Hibridación (Annealing): en este proceso se da la hibridación de los oligonucleótidos con el ADN molde (solo con secuencias complementarias específicas) a una temperatura entre 50 y 68 °C.
- Extensión: en este proceso la temperatura se eleva a 72 °C, para que la taq polimerasa sintetice el ADN de manera eficiente realizando la extensión del oligo en sentido 5´- 3´.

La repetición cíclica de estos pasos, mediante los diferentes cambios de temperatura se lleva a cabo en un equipo denominado termociclador (Vulliamy et al., 2008, pp. 477-509). Los pasos de la reacción PCR, se aprecian en la Figura 8.

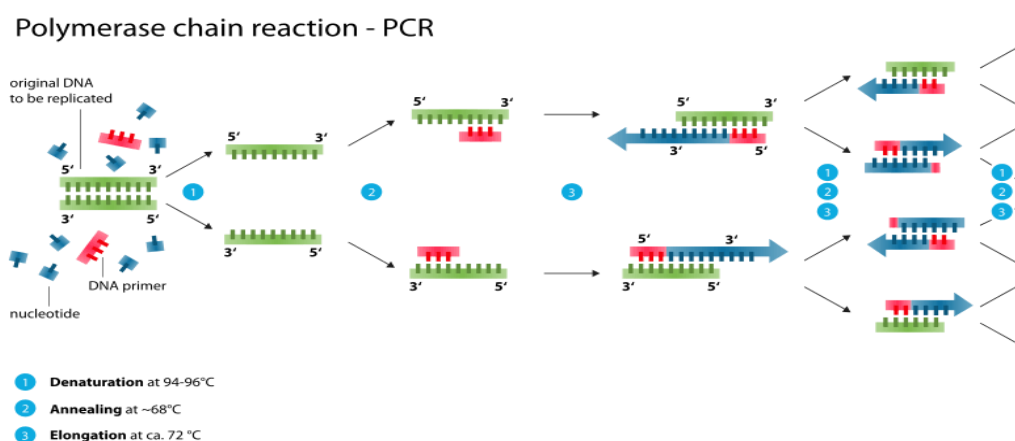


Figura 8. Representación gráfica de los pasos de la PCR.

Tomado de: Aryal (2018).

2.7.4. PCR Tiempo Real

La PCR tiempo real utiliza, los mismos principios de la PCR convencional, la diferencia es que se hace una detección y cuantificación del producto de la PCR en tiempo real a medida que avanza la reacción. Esta técnica se caracteriza por el uso de moléculas marcadas con fluorescencia para la visualización y detección de ampliaciones. Esta marcación se puede realizar de dos maneras: con

incorporación de colorantes de ADN en el producto PCR o con sondas marcadas con fluorescencia (FRET O TagMan). Básicamente, esta técnica utiliza un termociclador adaptado a un sistema de emisión y detección, el cual detecta cantidades progresivas de fluorescencia a diferentes longitudes de onda. Además consta de un software genera gráficas de fluorescencia en función del número de ciclos (Ginzinger, 2002; Krypuy, Newnham, Thomas, Conron, & Dobrovic, 2006).

2.7.5. Sondas de un solo marcaje (*SimpleProbe*)

Las sondas Simple Probe consisten en un único oligonucleótido que está marcado internamente por fluoresceína. El principio se basa en emisión de fluorescencia, ya que cuando la sonda se hibrida con su secuencia objetivo (SNP), emite más luz en comparación que cuando flota libremente en solución (Froehlich & Geulen, 2008). En la Figura 9, se puede apreciar el principio de detección por sondas de un solo marcaje.

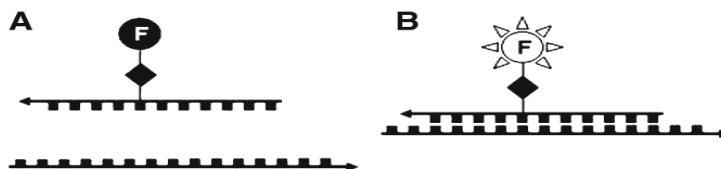


Figura 9. Principio de detección por sondas de un solo marcaje.

Tomado de :(Froehlich & Geulen, 2008).

A) Sonda apagada por un enlazador interno cuando está en solución libre.

B) Emisión de fluorescencia de colorante indicador (F) cuando la sonda reconoce a su objetivo complementario.

Durante el análisis de la curva de fusión la temperatura aumenta lentamente, y cualquier desajuste cubierto por la sonda desestabiliza el híbrido, lo que ocasionará que la Temperatura de *Melting* (T_m) disminuya. Es decir, la sonda se hibridará con el genotipo salvaje (WT) y si existe la presencia de una mutación,

se producirá la reducción de la T_m . En otras palabras, la sonda emite mayor fluorescencia, produciendo picos con temperaturas de fusión más altas cuando existe una hibridación con la secuencia sin alteraciones (genotipo *wild type*). Cuando hibrida con la secuencia mutada, la sonda emite una menor fluorescencia con picos con temperaturas menores a las del genotipo *wild type* (Lyon & Wittwer, 2009) (TIB MOLBIOL, 2016). En la Figura 10, se observa un ejemplo de curva de fusión de muestras con diferentes genotipos para FV G1691A.

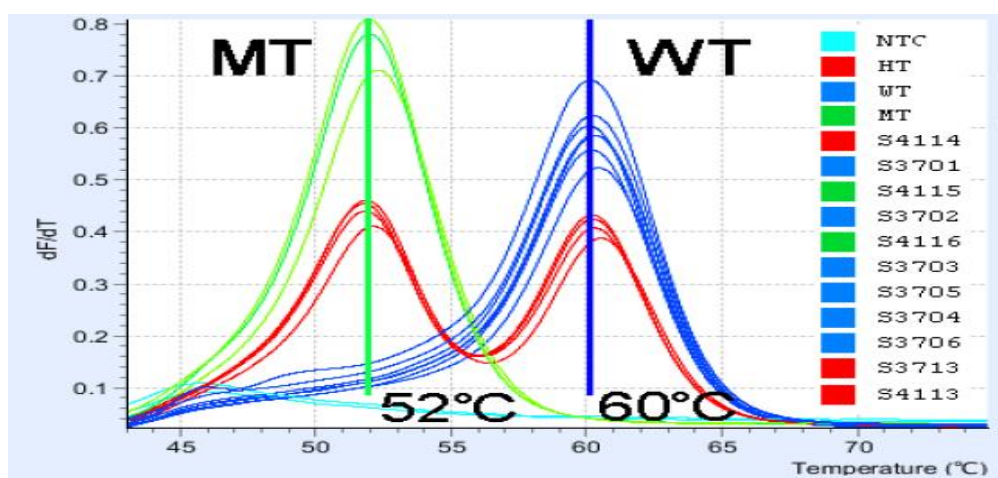


Figura 10. Ejemplo de curva de fusión de muestras con diferentes genotipos para FV G1691A, plataforma *LightCycler*®2,0, canal 530.

Tomado de : (TIB MOLBIOL, 2016).

2.8. El equilibrio de Hardy Weimberg

La genética de poblaciones permite calcular las frecuencias alélicas y genotipos en una población de individuos diploides y averiguar su comportamiento a lo largo de las generaciones. La suma de las frecuencias de un alelo normal y mutado tiene que ser igual a la unidad: $p + q = 1$ (Borstnar & López, 2016).

En una población con un n suficientemente grande y que no ha sufrido procesos de: migración, mutación, deriva génica, apareamiento selectivo, subestructura poblacional o selección las frecuencias genotípicas y alélicas se mantienen constante de generación en generación. Cuando se cumplen dichas condiciones

se puede plantear que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg (Borstnar & López, 2016).

La fórmula de este equilibrio es : $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$, donde los homocigotos normales son $P= p^2$; los heterocigotos son $H= 2pq$ y los homocigotos mutantes son $Q= q^2$ (Borstnar & López, 2016).

3. Capítulo III. PROCEDIMIENTOS

3.1. Población de estudio

Se recolectaron 168 muestras de sangre periférica, correspondientes a individuos universitarios y empleados de instituciones públicas residentes de los sectores centro, norte y sur, del Distrito Metropolitano de Quito, quienes previamente firmaron un consentimiento informado, aprobado por el comité de bioética de la “Universidad San Francisco de Quito” cuyo código de aprobación fue 2018-102T (ANEXO 1). El muestreo se realizó de manera aleatoria en base a los criterios de inclusión y exclusión que se muestran en la Tabla 3. La distribución de muestras por sexo fue del 50% en cada uno.

Tabla 3.

Criterios de inclusión y exclusión para la selección de individuos participantes del estudio.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
Ser de nacionalidad ecuatoriana residente en el Distrito Metropolitano de Quito	No ser ciudadano ecuatoriano residente al Distrito Metropolitano de Quito
Ser de etnia mestiza	No ser de etnia mestiza
Poseer ancestría (dos generaciones), de nacionalidad ecuatoriana	No poseer ancestría (dos generaciones) de nacionalidad ecuatoriana
Tener 18 o más años de edad	No poseer 18 o más años de edad

Tener autonomía (poder de decisión)	Tener limitación de autonomía (poder de decisión)
Aceptar voluntariamente la participación en el presente estudio y firmar el consentimiento informado	No aceptar voluntariamente la participación en el presente estudio y firmar el consentimiento informado

3.2. Diseño de la investigación

El estudio fue de tipo descriptivo transversal. Donde la población total fue de 168 individuos, 84 de género femenino y 84 de género masculino.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Diagrama de flujo resumen de la metodología

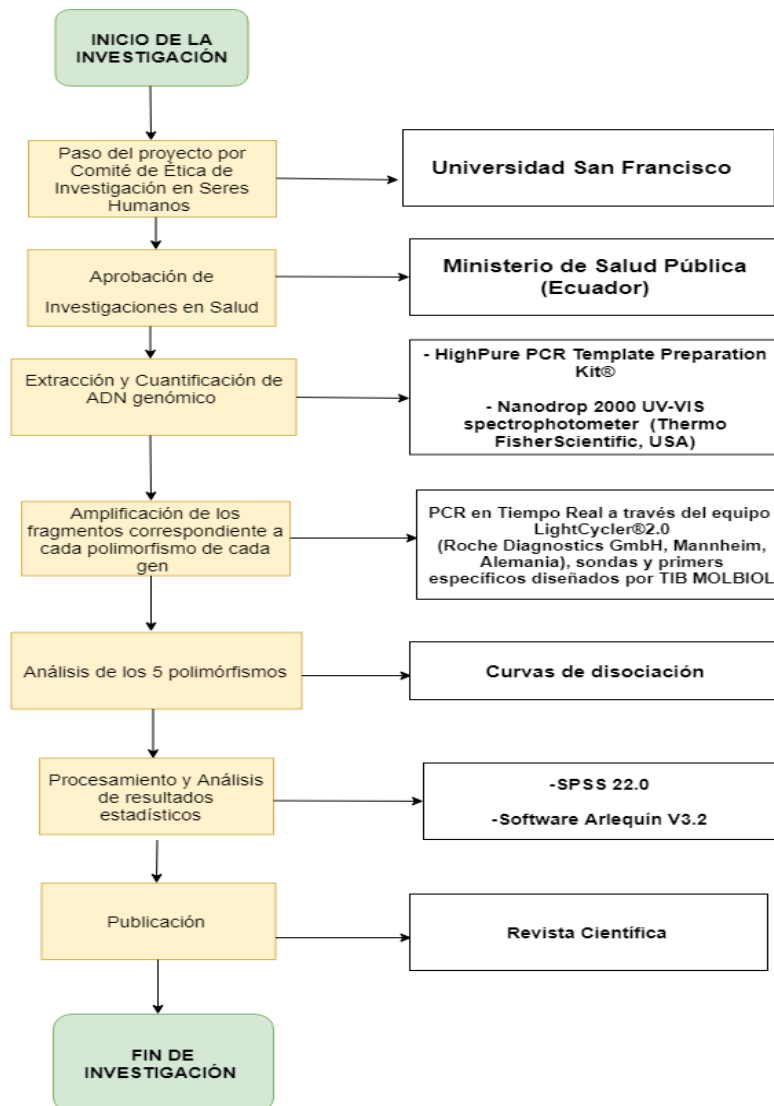


Figura 11. Esquema del diseño experimental del estudio

3.3.2. Recolección de muestra de sangre periférica

Se recolectó aproximadamente 2 - 4 mL de sangre periférica, tomada de la vena cefálica o mediana cubital cercana al pliegue del antebrazo utilizando una cápsula Vacutainer® y tubos EDTA como anticoagulante.

3.3.3. Transporte y Almacenamiento

Las muestras se transportaron en una hielera portátil con medio refrigerante hasta el Servicio de Genética Médica del Hospital de Especialidades Fuerzas

Armadas No.1, donde se las dejó en rotación, en un agitador rotativo de marca Glas-Col®, durante 15 minutos. Finalmente fueron almacenadas a -20 °C para sus posteriores análisis.

3.3.4. Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica

Se obtuvo ADN genómico a partir de sangre periférica utilizando el *High Pure PCR Template Preparation Kit*® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, No. Catálogo 11796828001). Se empleó el protocolo propuesto por Roche Diagnostics GmbH (2008), con leves modificaciones adaptadas al Servicio de Genética Médica del Hospital de Especialidades Fuerzas Armadas No. 1, según se detalla a continuación:

1. A partir de las muestras de sangre obtenidas. En un tubo eppendorf de 1,5 mL se colocó 200 µL de sangre previamente descongelada y homogenizada en un agitador rotativo. A continuación, para iniciar la lisis celular y digerir los productos del lisado se añadió 200 µL de *Binding Buffer* y 40 µL de *proteínasa K*. Se llevó la mezcla a vórtex por 15 segundos e inmediatamente fue incubada en baño maría por un periodo de 10 minutos a 70 °C.
2. Para la precipitación de ácido nucleico se añadió 100 µL de Isopropanol, se mezcló por vórtex y se centrifugó a 1000 x. g durante un minuto. A continuación, la mezcla se pasó a través de una columna con membrana de fibra de vidrio y un tubo colector proporcionados en el *kit*, por centrifugación a 8000 x. g., durante 2 minutos. Finalmente se desechó el tubo colector y su contenido. Como resultado de este paso, se produce la adhesión del ácido nucleico a la membrana de la columna.
3. El ácido nucleico adherido a la columna fue sometido a tres lavados: Inicialmente con 500 µL de *Inhibitor Removal Buffer* y dos lavados

posteriores con 500 μL de *Wash Buffer*. Para cada lavado, se aplicó una centrifugación a 8000 x. g, y se descartó el tubo colector y su contenido, Posteriormente, se realizó una nueva centrifugación a 13,000 x. g, para descartar algún tipo de inhibidor y desalojar la totalidad del etanol.

4. Para la elución del ácido nucleico, se adicionó 100 μL de *Elution Buffer* (previamente calentado en baño maría a 70 °C) y se centrifugó a 8000 x. g, por dos minutos. Se realizó una segunda elución, pasando el producto de la primera elución nuevamente por la columna y se centrifugó con el fin de aumentar la concentración del ácido nucleico.
5. Finalmente, el ADN obtenido fue alicuotado y almacenado a -20 °C para procedimientos posteriores.

3.3.5. Cuantificación de ADN genómico

El análisis cuantitativo y cualitativo del ADN se realizó mediante espectrofotometría, en el equipo *Nanodrop 2000 UV-VIS spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific, USA*). La solución blanco empleada fue *Elution Buffer* del kit *High Pure PCR Template Preparation Kit®* (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania*).

Para la cuantificación de cada muestra, se utilizaron 2 μL de ADN que fueron medidos por triplicado para tomar los datos promedio en dos índices de absorbancia: 260/280 nm y 260/230 nm. Según se muestra en el ANEXO 2. Los valores obtenidos fueron evaluados respecto a los valores que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.

Índices de pureza medidos en A260/A280 y A260/A230 y sus respectivos rangos para la verificación de pureza o contaminación de ADN.

Índice de pureza (nm)	RANGO	
	1,8 a 2	Menor a 1,8
A260/A280	ADN puro	Posible contaminación por proteínas, fenoles , compuestos aromáticos u otras sustancias contaminantes
A260/A230	1,8 a 2,2	Menor a 1,8
	ADN puro	Posible contaminación por solventes orgánicos u otras sustancias contaminantes

Tomado de Thermo Scientific (2016).

Aunque se considera a los índices de purzas indicadores significativos de la calidad de ADN, el mejor y más confiable indicador siempre será la funcionalidad del mismo en la PCR en tiempo real (Thermo Scientific, 2016).

3.3.6. PCR en tiempo real

Una vez extraído y cuantificado el ADN, se identificaron los polimorfismos G1691A (Factor V de Leiden), G20210A (Factor II Protrombina), MTHFR C677T, MTHFR A1298C, y PAI-1(4G/5G) usando la técnica PCR en Tiempo real (qPCR) y posteriormente se analizó las respectivas curvas de disociación con el *software*

Light Cycler 1.X Instruments versión 4.1. Para ello se utilizó el equipo *LightCycler®2,0* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), y *primers* con sondas específicas diseñados por *TIB MOLBIOL*, Berlín, Alemania).

Los volúmenes y concentraciones finales de los reactivos, para la mix de reacción de PCR en Tiempo real fueron idénticas para los diferentes polimorfismos, se obtuvieron de los insertos de los *kits* comerciales *LightMix®*. Los cuales se obtuvieron de la casa comercial (*TIB MOLBIOL*). Dichos volúmenes y concentraciones se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5.

Volúmenes y concentraciones para la conformación de la reacción de la PCR Tiempo Real para los cinco polimorfismos estudiados.

Reactivos	Volumen en (µL) por reacción
Agua grado PCR	5,2
Mg² concentración de 25 mM	0,8
Fast Start DNA Master HyProbe (Mix 1)	1
Primer + sondas	1
ADN (56 ng/µL)	2
VOLUMEN FINAL DE MIX	10

Adaptado de TIB MOLBIOL (2016).

Para la amplificación y detección dada se utilizó el programa de termociclador sugerido por el fabricante de los kits *LightMix®* de la casa comercial *TIB MOLBIOL*, correspondientes a cada polimorfismo. Las condiciones utilizadas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6.

Programa de termociclador y detección por PCR Tiempo Real para la amplificación y análisis de los cinco polimorfismos estudiados.

PASO	Denaturación	Amplificación			Disociación			Enfriamiento
Parámetro								
Modo de análisis	Ninguno	Modo Cuantificación			Curvas de disociación			Ninguno
Ciclos	1	45			1			1
Temperatura [°C]	95	95	60	72	95	43	75	40
Tiempo [min-s]	10 min	5 s	10 s	15 s	20 s	20 s	0 s	30 s
Tasa de rampa [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0,2	20
Modo de adquisición	Ninguno	Ningu no	Úni co	Ningu no	Ningu no	Ningu no	Conti nuo	Ninguno

Adaptado de TIB MOLBIOL (2016).

3.3.6.1. Determinación del SNP G1691A- SNP G20210A- SNP C677T – SNP A1298C y PAI-1

A partir del producto PCR se amplificaron fragmentos de los 5 SNP de cada gen estudiado para ello se hizo uso de los *kits*: *LightMix®* (TIBMOLBIOL, Berlín, Alemania), dichos *kits* contenían sondas específicas: *SimpleProbe®* (TIBMOLBIOL GmbH, 2016) para la amplificación correspondiente a cada polimorfismo. Estas sondas utilizan el mecanismo de sondas de un solo marcaje.

3.3.6.2. Determinación de los genotipos de FV-FII-MTHFR-PAI-1

En la primera corrida, se utilizó tres controles sintéticos (*wild type* – heterocigoto-mutante) correspondientes a cada uno de los polimorfismos y un control negativo

(agua grado PCR), proporcionados en los *kits*, con el fin de obtener curvas de disociación estándares para cada SNP, para que estas sean comparadas con las subsiguientes curvas de las 168 muestras. En las siguientes corridas se empleó solo el control sintético correspondiente al control heterocigoto de cada SNP y el control negativo debido a indicaciones de *kit*.

En el equipo, el canal de lectura utilizado para la identificación de los cinco polimorfismos, fue el 530 nm y el modo de análisis *Genotyping* y *Tm calling*.

Una vez concluida la corrida del programa, el equipo arrojó gráficas que indicaron fluorescencias vs temperaturas donde se formaron picos gracias a las diferentes temperaturas de disociación. Esto permitió apreciar los genotipos de cada muestra analizada, de tal forma que el pico correspondiente al genotipo (mutante), se formó a menor temperatura que el pico del genotipo (*wild type*), y el genotipo (heterocigoto) formó dos picos característicos, esto en los 5 SNP. Las características e interpretación de los genotipos y las temperaturas de cada SNP, se determinó de acuerdo a la Tabla 7.

Se aceptó la variación de temperatura de disociación de: $\pm 0,5$ °C entre muestras analizadas con el mismo genotipo, $\pm 1,5$ °C entre el genotipo de los estándares y las muestras, $\pm 1,5$ °C entre los picos de fusión para los genotipos heterocigotos (TIB MOLBIOL, 2016) . En la Tabla 7, se aprecia los genotipos según temperaturas de disociación de los 5 polimorfismos.

Tabla 7.

Genotipos según temperaturas de disociación de los 5 polimorfismos

Gen	SNP	rs	L.A (Pb)	Temperatura		Genotipo
				T1	T2	
FV	G1691A	6025	110	-	59-61 °C	G/G (wild type)
				G=51-53 °C	A=59-61 °C	G/A (Heterocigoto)
				51-53 °C	-	A/A (mutante)
FII	G20210 A	1799963	106	-	60-63 °C	G/G (wild type)
				G=50-53 °C	A=60-63 °C	G/A (Heterocigoto)
				A= 60-63 °C	-	A/A (mutante)
MTHFR	A1298C	1801131	269	-	62-62 °C	A/A (wild type)
				A=56-58 °C	C=62-64 °C	A/C (Heterocigoto)
				56-58 °C	-	C/C (mutante)
MTHFR	C677T	1801133	288		65-68 °C	C/C (wild type)
				C=58-61 °C	T= 65-68 °C	C/T (heterocigoto)
				58-61 °C		T/T (mutante)
SERPIN E1	4G/5G	1799762	345		59-62 °C	5G/5G (wild type)
				G=52-55 °C	A=59-62 °C	4G/5G (heterocigoto)
				52-55 °C	-	4G/4G (mutante)

L.A = Longitud del amplicón
Pb= Pares de bases

3.4. Evaluación estadística de los polimorfismos

3.4.1. Análisis descriptivo de la población

Se empleó estadística descriptiva para caracterizar la población de estudio y para la estimación de las frecuencias de las variantes genéticas de los individuos. Las variables cualitativas se expresaron como frecuencias y porcentajes, y las variables cuantitativas se expresaron con promedios y su respectiva desviación estándar.

Se consideró como variables de este estudio a los polimorfismos de los genes de Factor V, Factor II, MTHFR A1298C, MTHFR C677T y PAI-1, los mismos que pueden ser de tipo homocigotos (*wild type*), heterocigotos o mutantes. A partir de ello, se establecieron sus frecuencias. La operacionalización de las variables se muestra en Tabla 8.

Tabla 8.

Operacionalización de las 5 variables del estudio.

Variable	Interpretación	Nivel de medición	Definición operativa
FV de Leiden	Independiente	Cualitativa politómica	<i>Wild type</i> , heterocigoto, mutante
FII Protrombina	Independiente	Cualitativa politómica	<i>Wild type</i> , heterocigoto, mutante
MTHFR A1298C	Independiente	Cualitativa politómica	<i>Wild type</i> , heterocigoto, mutante
MTHFR C677T	Independiente	Cualitativa politómica	<i>Wild type</i> , heterocigoto, mutante
PAI - 1	Independiente	Cualitativa politómica	<i>Wild type</i> , heterocigoto, mutante

3.4.2. Cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias alélicas y genotípicas para cada polimorfismo se calcularon por conteo directo sobre una base de datos construida SPSS 22 (SPSS Inc, 2013).

3.4.3. Equilibrio de Hardy Weinberg

Para el equilibrio de ligamiento y Hardy – Weinberg, se utilizó el test exacto de Fischer implementado en el software Arlequín V3.2 (Excoffier & Lischer, 2010) para comparaciones por pares, el nivel de significancia p se ajustó con la corrección de Bonferroni $p = \frac{0,05}{10} = 0,005$.

4. Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Extracción de ADN

El promedio de la concentración de ADN de las 168 muestras fue 56 ng/μL, con un valor mínimo de 16 ng/μL y un valor máximo de 265 ng/μL. Estos resultados concuerdan con las especificaciones del fabricante, las cuales manifiestan que se obtiene concentraciones de ADN de 30 a 60 ng/μL de muestras de sangre. El valor mínimo y máximo observado pudo producirse debido a la variación del rendimiento entre las muestras ya que esta depende de la cantidad de leucocitos presentes (Roche, 2012).

Los resultados en el índice de absorbancia a (260/280 nm) mostraron que las muestras tienen una buena calidad y no existió contaminación significativa de proteínas, el promedio en este índice fue de 1,8, que se encuentra dentro del rango 1,8 a 2 establecido en la guía de usuario de *Nanodrop 2000 UV-VIS spectrophotometer*. Las muestras en el índice de absorbancia 260/230 nm, dieron un promedio de 1,7, valor un poco bajo comparado con el rango de 1,8 a 2,2. Esto pudo deberse a una contaminación por sales, carbohidratos o fenoles

o por algún problema en el tampón de resuspensión (Banco Nacional de ADN, 2010).

Los datos promedios de concentración y en los dos índices de absorbancia de las 168 muestras se consideran dentro del rango de ADN con pureza óptima 1,8 a 2.

Los resultados de las mediciones en los dos índices de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm y la concentración promedio, en su totalidad se muestran en el Anexo 2 y un ejemplo en la Tabla 9.

Tabla 9.

Ejemplo de la lectura en rangos 260/280 y 260/230 en el equipo Nanodrop 2000 UV-VIS spectrophotometer

Sample ID	Nucleic Acid Conc,	Unit	260/280	260/230
BLANCO	-0,2	ng/μL	0,78	-1,91
PTH02	41,8	ng/μL	1,96	1,7
PTH02	44,4	ng/μL	1,87	1,62
PTH02	41,5	ng/μL	1,99	1,73
PTH03	57,4	ng/μL	1,99	2,06
PTH03	56,9	ng/μL	1,98	2,08
PTH03	56,6	ng/μL	1,99	2,09
PTH04	54,9	ng/μL	1,9	1,61
PTH04	54,4	ng/μL	1,91	1,6
PTH04	55,9	ng/μL	1,85	1,54
PTH05	44,9	ng/μL	1,78	1,36
PTH05	44,3	ng/μL	1,83	1,39
PTH05	44,5	ng/μL	1,81	1,39
PTH06	68,4	ng/μL	1,73	1,29
PTH06	68,1	ng/μL	1,76	1,28
PTH06	67,4	ng/μL	1,74	1,3

Nota: PTH corresponde al código asignado a los individuos de este estudio.

4.2. Descripción del grupo de estudio

En la presente investigación se estudió un total de 168 individuos: 50 % de sexo masculino y 50% de sexo femenino. La edad promedio de la población fue de 36 años. En los datos de la Tabla 10 y 11, se observó que la mayoría de la población no presenta patologías relacionadas con eventos tromboticos, así como la mayoría de familiares de primer grado. Adicionalmente el 100 % de la población no presentó ningún infarto previo.

En la población de estudio se observó que no existe diferencia significativa entre hombres y mujeres con respecto a las patologías de los individuos, con excepción de los abortos espontáneos. En cuanto a las patologías en familiares de primer grado no se observó diferencia como de muestra en la Tabla 12, donde se aprecia el valor de p tanto en patologías de individuos, como en familiares de primer grado, obtenido con un nivel de significancia de 0,05.

Tabla 10.

Descripción de la población de estudio

	MUJERES (N=84)		HOMBRES (N=84)		TOTAL= 168	
Edad media \pm DS	35 \pm 14		38 \pm 12			
Edad máxima	49		50			
Edad mínima	21		26			
PATOLOGÍAS	SI	NO	SI	NO	SI	NO
Varices, No. (%)	22 (26,19)	62 (73,81)	10 (11,90)	74 (88,10)	32 (19,05)	136 (80,95)
Trombosis venosa, No. (%)	1 (1,19)	83 (98,81)	3 (3,57)	81 (96,43)	4 (2,38)	164 (97,62)
Parálisis, No. (%)	3 (3,57)	81 (96,43)	2 (2,38)	82 (97,62)	5 (2,98)	163 (97,02)

Infartos, No. (%)	0 (0,00)	84 (100)	0 (0,00)	84 (100,0)	0 (0,00)	168 (100,0)
Abortos espontáneos, No. (%)	10 (11,90)	74 (88,10)	0 (0,00)	84 (100,0)	10 (5,95)	158 (94,05)
Pérdida fetal, No. (%)	4 (4,76)	80 (95,24)	0 (0,00)	84 (100,0)	4 (2,38)	164 (97,62)
Policitemia Vera, No. (%)	4 (4,76)	80 (95,24)	3 (3,57)	81 (96,43)	7 (4,17)	161 (95,83)
Consumo de anticoagulantes No. (%)	0 (0,00)	84 (100)	3 (3,57)	81 (96,43)	3 (1,79)	165 (98,21)
<i>DS: Desviación estándar</i>						

Tabla 11.

Descripción de patologías en familiares de primer grado

PATOLOGÍAS EN FAMILIARES	MUJERES (N=84)		HOMBRES (N=84)		HOMBRES (N=84)	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO
Varices, No. (%)	30 (35,71)	54 (64,29)	24 (28,57)	60 (71,43)	54 (32,14)	114 (67,86)
Trombosis venosa, No. (%)	6 (7,14)	78 (92,86)	4 (4,76)	80 (95,24)	10 (5,95)	158 (94,05)
Parálisis, No. (%)	6 (7,14)	78 (92,86)	2 (2,38)	82 (97,62)	8 (4,76)	160 (95,24)

Infartos, No. (%)	9 (10,71)	75 (89,29)	9 (10,71)	75 (89,29)	18 (10,71)	150 (89,29)
Abortos espontáneos, No. (%)	9 (10,71)	75 (89,29)	2 (2,38)	82 (97,62)	11 (6,55)	157 (93,45)
Pérdida fetal, No. (%)	7 (8,33)	77 (91,67)	0 (0,00)	84 (100,0)	7 (4,17)	161 (95,83)
Policitemia Vera, No. (%)	10 (11,90)	74 (88,10)	1 (1,9)	83 (98,81)	11 (6,55)	157 (93,45)
Consumo de anticoagulante, No. (%)	7 (8,33)	77 (91,67)	2 (2,38)	82 (97,62)	9 (5,36)	159 (94,64)
<i>DS: Desviación estándar</i>						

Tabla 12.

Valores de *p*, obtenidos con un nivel de significancia de 0,05.

PATOLOGÍAS	Valor de p
Varices	0,15
Trombosis venosa	0,31
Parálisis	0,50
Infartos	No hay
Abortos espontáneos	0,01
Pérdida fetal	0,60
Policitemia Vera	0,50
Consumo de anticoagulantes	0,12
PATOLOGÍAS EN FAMILIARES	
Varices	0,20

Trombosis venosa	0,37
Parálisis	0,14
Infartos	0,60
Abortos espontáneos	0,28
Pérdida fetal	0,07
Policitemia Vera	0,05
Consumo de anticoagulante	0,08

4.3. Identificación de genotipos por curvas de disociación

Como resultado de la PCR en Tiempo Real, el *software* de la plataforma *LightCycler*® 2,0 en el canal 530 nm, arrojo curvas de disociación (Cambio delta de fluorescencia vs temperatura). Los genotipos se discriminaron según la diferencia de temperatura de *melting* de cada pico.

Se consiguió 168 curvas por cada SNP estudiado, las cuales fueron muy similares a las curvas controles con una desviación estándar promedio $DS = 0,13$.

4.3.1. Curvas de disociación de los diferentes genotipos del SNP G1691A (rs6025)

En la población estudiada, 165 (98 %) de las curvas presentaron un solo pico de *melting* con una temperatura promedio de $\approx 59,43$ °C siendo compatible con el genotipo G/G (*wild type*). Se detectaron 3 individuos heterocigotos G/A, con dos picos y temperaturas promedio de $\approx 50,87$ °C y $59,70$ °C respectivamente. No se encontraron individuos homocigotos mutantes por ende no se pudo apreciar curvas de disociación con el genotipo A/A. Un ejemplo de cada genotipo se muestra en las Figuras: 12 y 13.

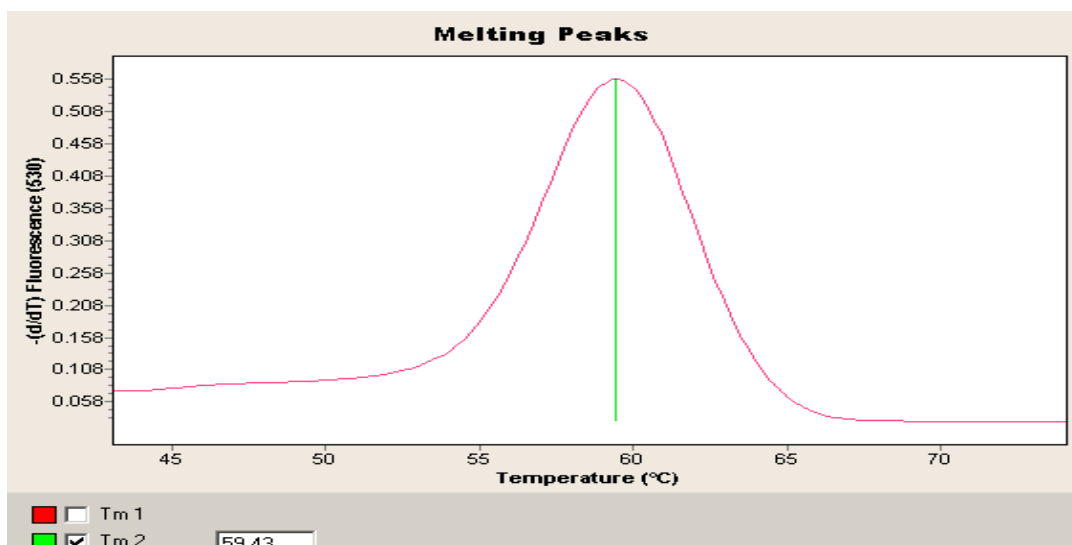


Figura 12. Curva de disociación con genotipo G/G.

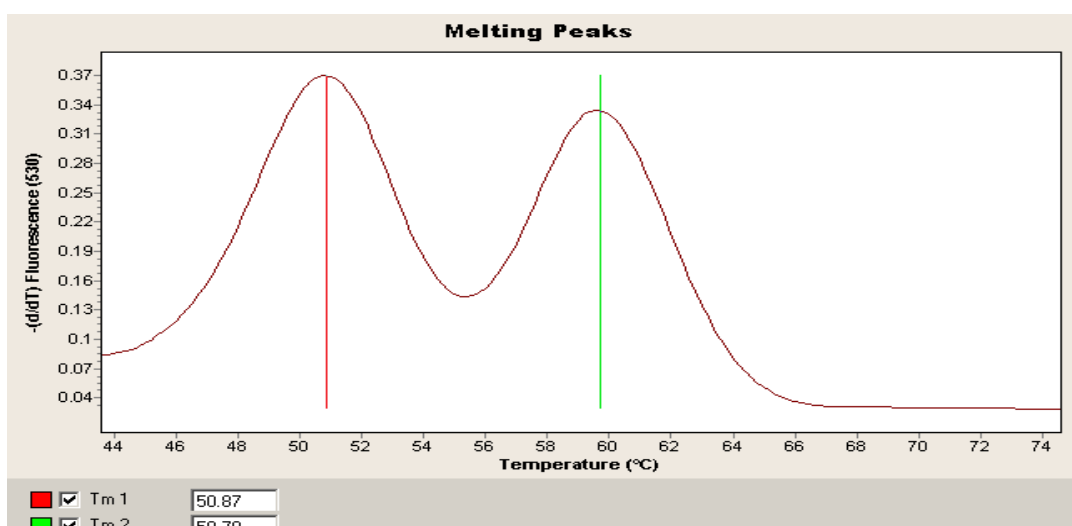


Figura 13. Curva de disociación con genotipo G/A.

4.3.2. Curvas de disociación de los diferentes genotipos del SNP G20210A (s1799963)

En la población estudiada, 162 (96 %) de las curvas presentaron un solo pico de *melting* con una temperatura promedio de $\approx 60,20$ °C siendo compatible con genotipo G/G (*wild type*). Se detectaron 6 individuos heterocigotos G/A con dos picos y temperaturas promedio de $\approx 50,42$ °C y $\approx 60,36$ °C respectivamente. Al igual que el SNP G1691A, no se encontró homocigotos mutantes A/A. Un ejemplo de los genotipos encontrados se muestra en las Figuras: 14 y 15.

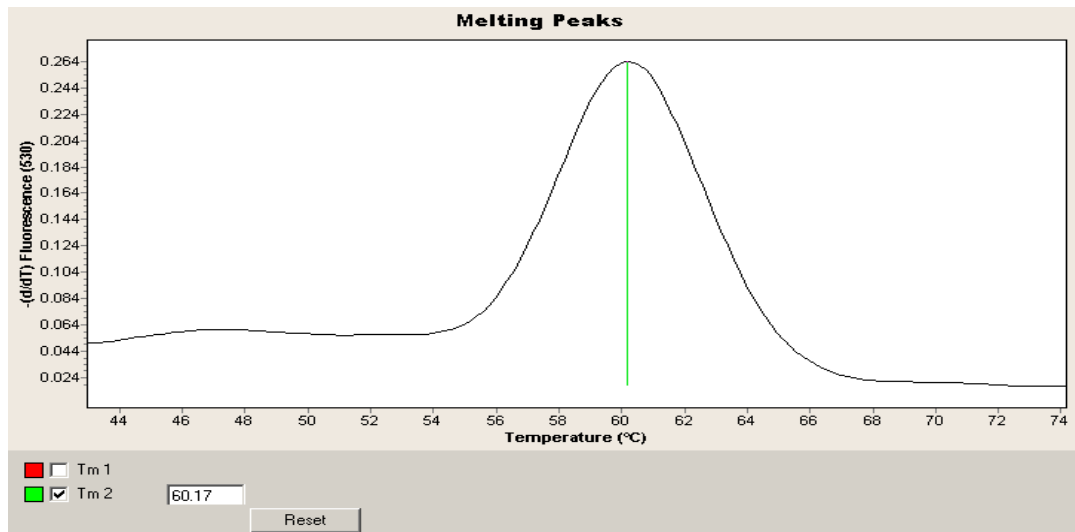


Figura 14. Curva de disociación con genotipo G/G.

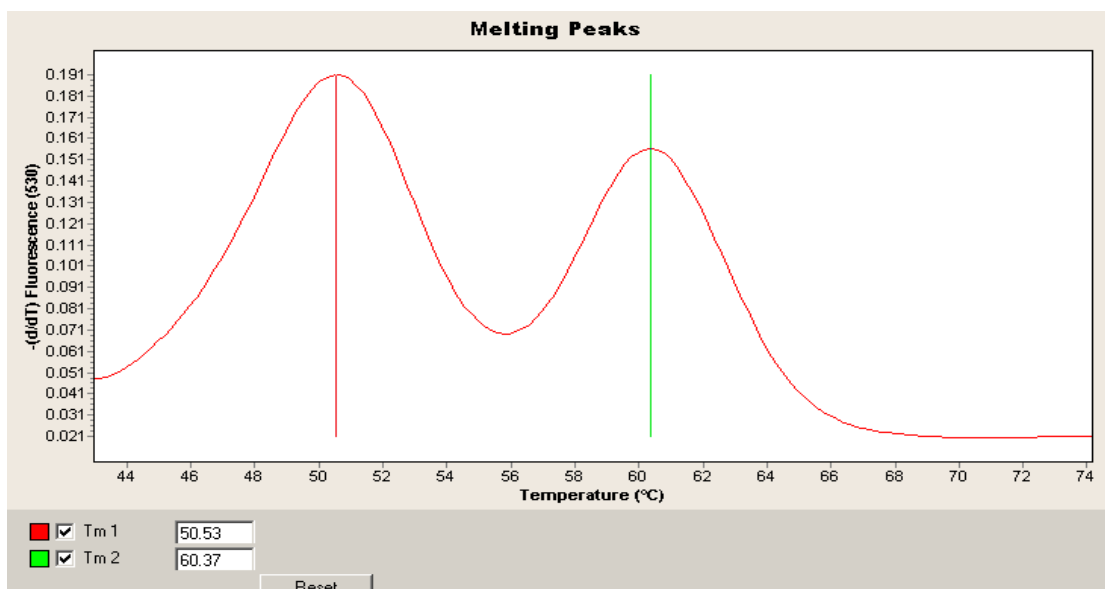


Figura 15. Curva de disociación con genotipo G/A.

4.3.3. Curvas de disociación de los diferentes genotipos del SNP C677T (rs1801133)

En la población estudiada, 44 (26,19 %) de las curvas presentaron un solo pico de *melting* con una temperatura promedio $\approx 65,71$ °C siendo compatible con el genotipo C/C (*wild type*). Se detectaron 86 (51,19 %) individuos heterocigotos

C/T con dos picos y temperaturas promedio de $\approx 59,27$ °C y $66,08$ °C. Finalmente, se detectó 38 (22,52 %) individuos homocigotos mutantes T/T con un pico de *melting* y una temperatura promedio de $\approx 59,07$ °C. Un ejemplo de los genotipos encontrados se muestra en las Figuras: 16, 17 y 18.

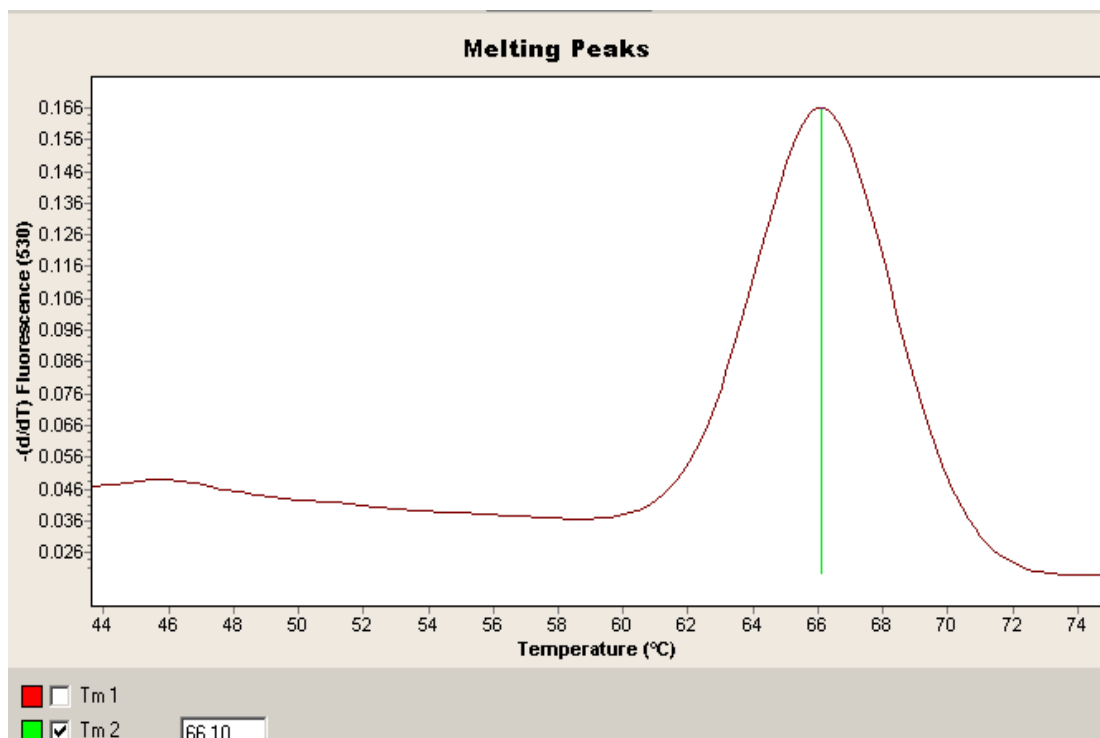


Figura 16. Curva de disociación con genotipo C/C.

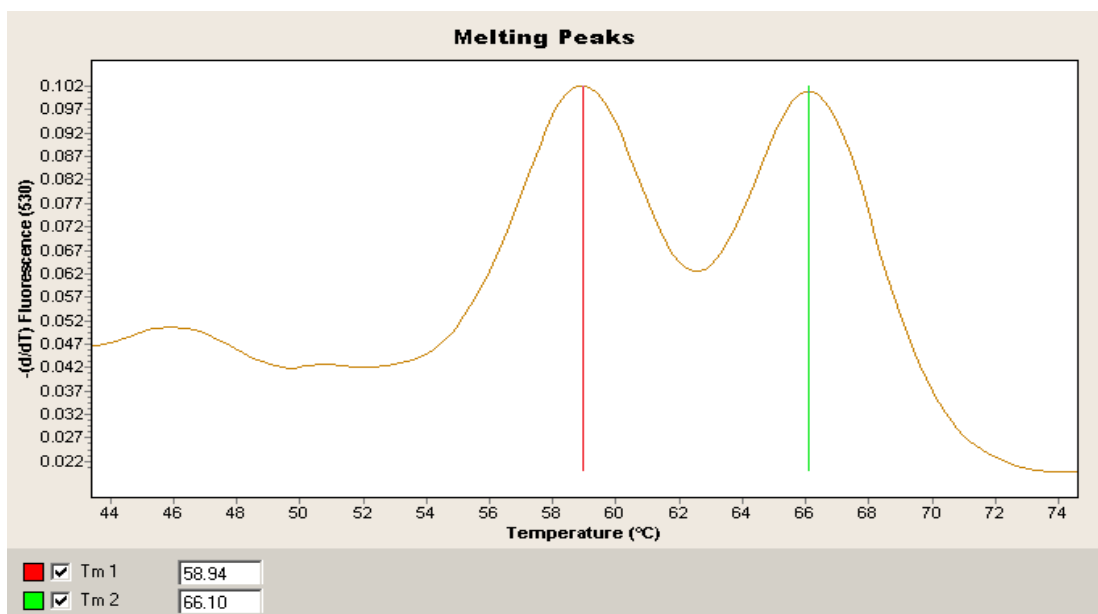


Figura 17. Curva de disociación con genotipo C/T.

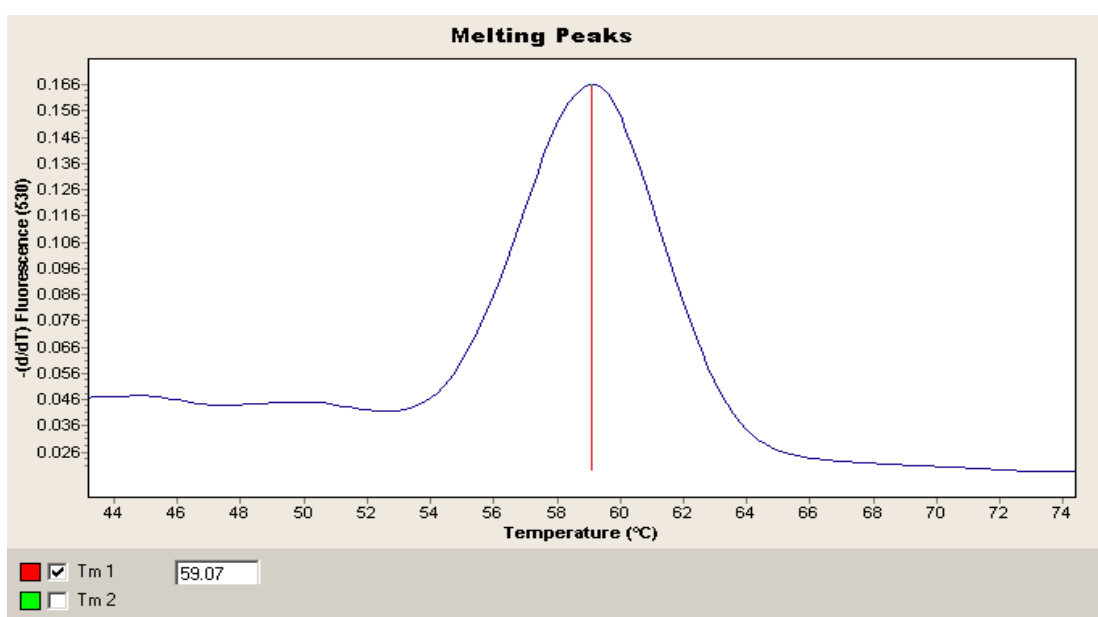


Figura 18. Curva de disociación con genotipo T/T.

4.3.4. Curvas de disociación de los diferentes genotipos del SNP A1298C (1801131)

En la población estudiada, de 135 (80,36 %) de las curvas presentaron un pico con una temperatura promedio de $\approx 61,82$ °C compatible con el genotipo A/A

(*wild type*). Se detectó 29 (17,26 %) individuos heterocigotos C/T, con dos picos y temperaturas promedio de $\approx 55,53$ °C y $62,15$ °C. Finalmente, se detectó 4 (2,38 %) individuos homocigotos mutantes T/T con un pico de *melting* y temperatura promedio de $\approx 55,42$ °C. Un ejemplo de los genotipos encontrados se muestra en las Figuras: 19, 20 y 21.

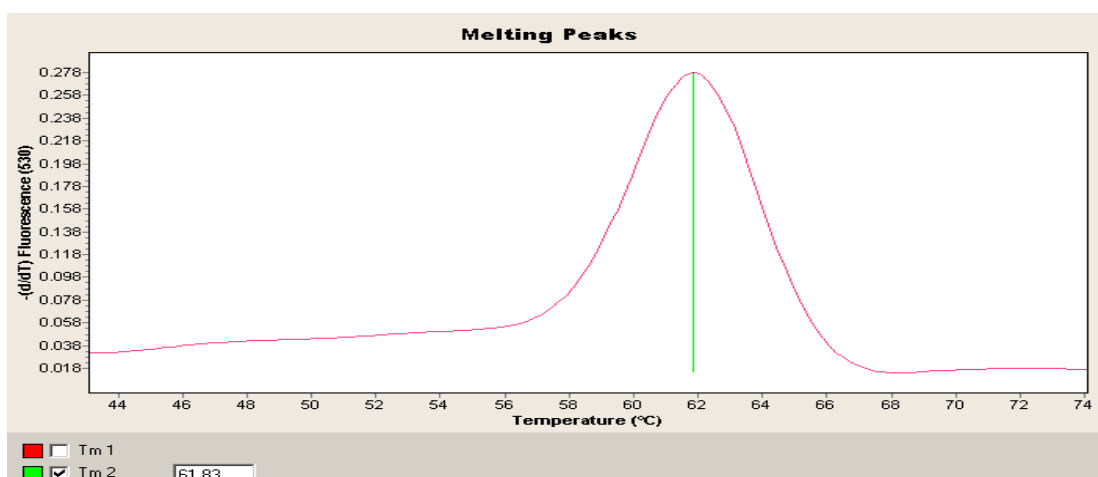


Figura 19. Curva de disociación con genotipo A/A.

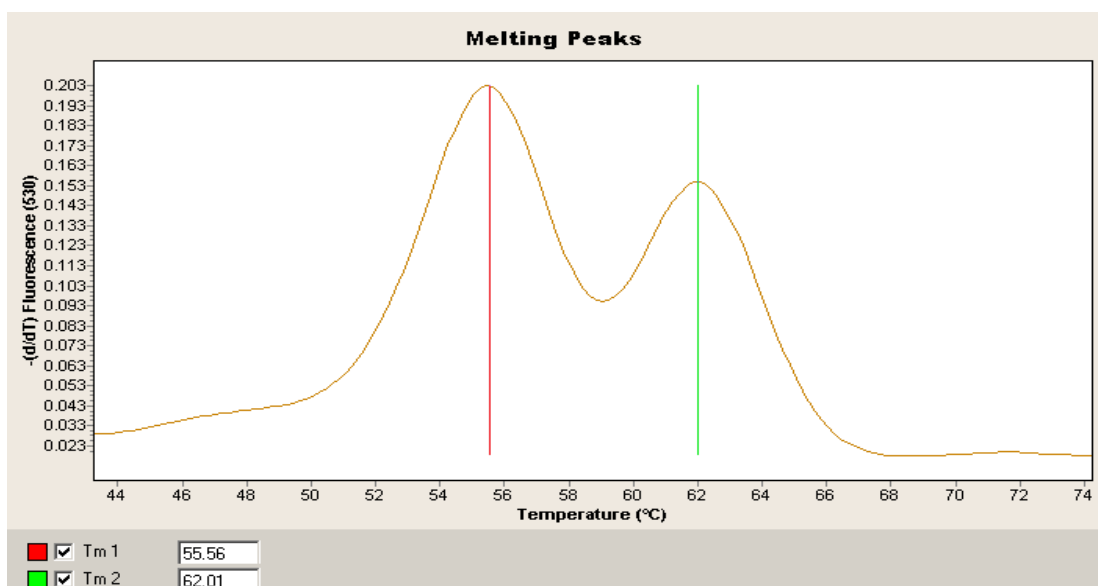


Figura 20. Curva de disociación con genotipo A/C.

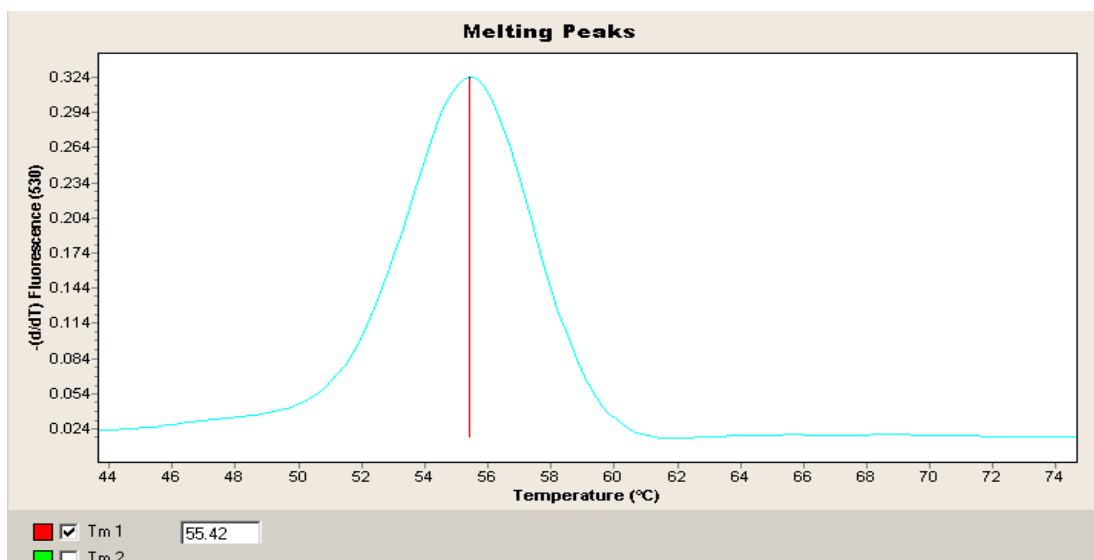


Figura 21. Curva de disociación con genotipo C/C.

4.3.5. Curvas de disociación de los diferentes genotipos del SNP 4G/5G (rs1799762)

En la población estudiada, 98 (58,33 %) de las curvas presentaron un solo pico de *melting* con una temperatura promedio de $\approx 59,42$ °C siendo compatible con el genotipo 5G/5G (*wild type*). Se detectó 59 (35,12 %) individuos heterocigotos 4G/5G que arrojaron dos picos con temperaturas promedio de $\approx 52,56$ °C y 60,31 °C. Finalmente se detectó 11 (6,55%) individuos homocigotos mutantes 4G/4G con un pico y temperatura promedio de $\approx 52,66$ °C. Un ejemplo de los genotipos encontrados se muestra en las Figuras: 22, 23 y 24.

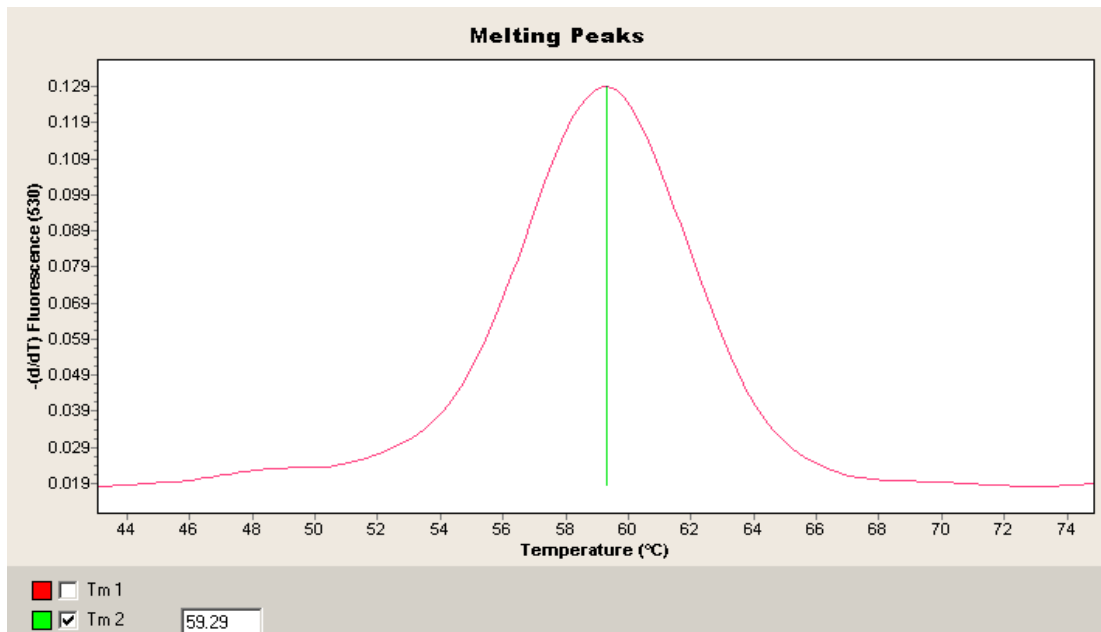


Figura 22. Curva de disociación con genotipo 5G/5G.

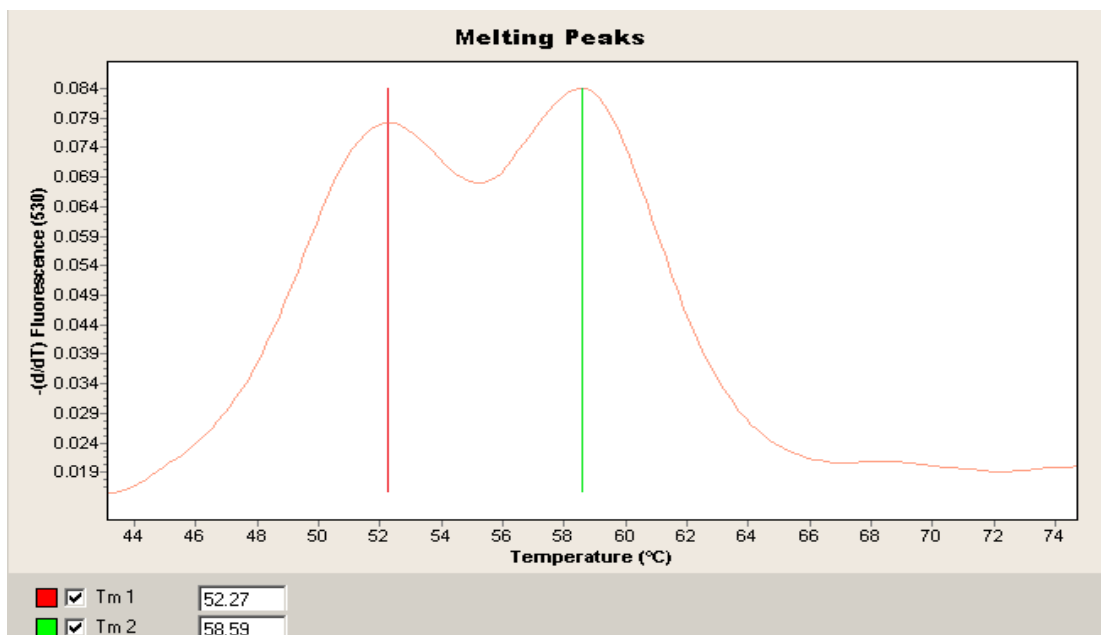


Figura 23. Curva de disociación con genotipo 4G/5G.

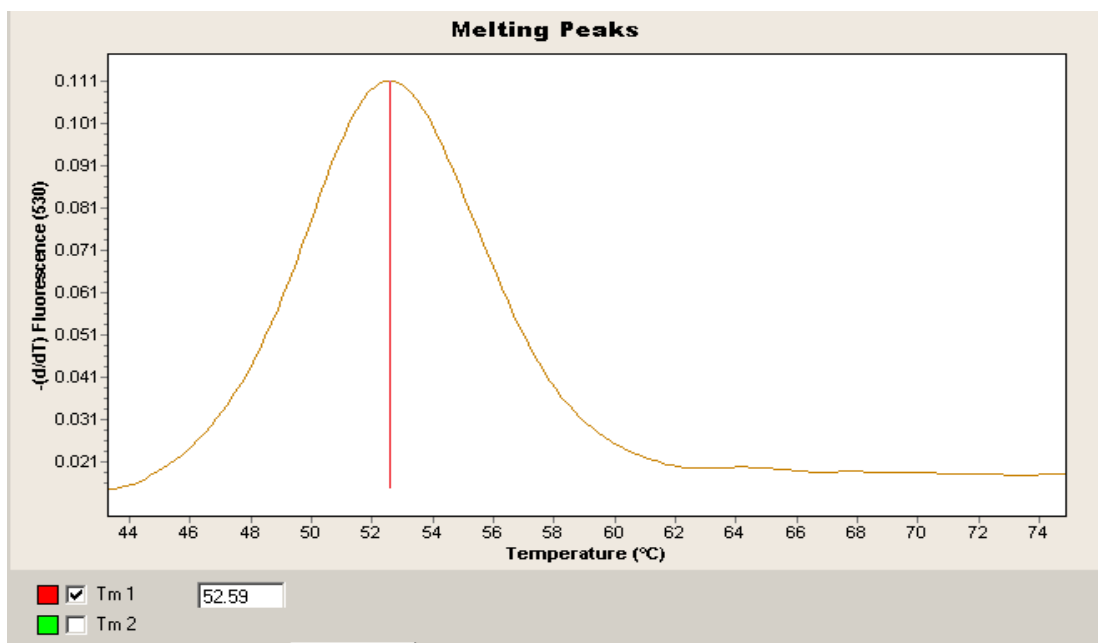


Figura 24. Curva de disociación con genotipo 4G/4G.

4.4. Análisis de la frecuencia genotípica y alélicas

4.4.1. Distribución genotípica y alélica del SNP G1691A del gen FV

En la Figura 25, se puede apreciar los genotipos del SNP G1691A del gen FV y su distribución en la población estudiada. Por otra parte, en la Tabla 13 se aprecia su distribución genotípica y alélica en función del género.

En la población de la presente investigación solo se encontró dos genotipos: el predominante (G/G) con un 98,21 % y el (G/A) con 1,79 %, no se observó el genotipo (A/A).

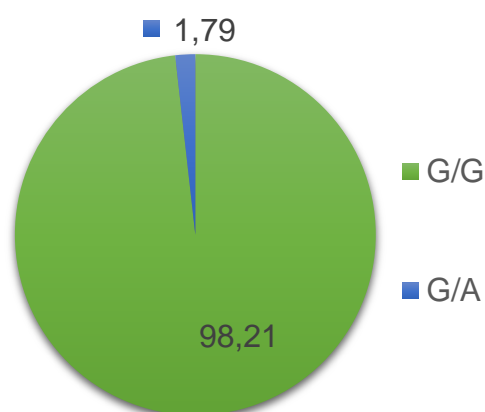


Figura 25. Distribución genotípica del SNP G1691A del gen FV.

Tabla 13.

Distribución genotípica y alélica del SNP G1691A del gen FV considerando el género

GENOTIPOS	MUJERES (%) N=84	HOMBRES (%) N=84	TOTAL (%) = 168
G/G	81 (96,4)	84 (100)	165 (98,21)
G/A	3 (3,6)	0 (0)	3 (1,79)
A/A	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ALELOS	Mujeres (%) NA=168	Hombres (%) NA=168	TOTAL A (%) =336
G	165 (98,21)	168 (100)	333 (99,11)
A	3 (1,79)	0 (0)	3 (0,89)
NA = NÚMERO DE ALELOS			
TOTAL A = TOTAL ALELOS			

4.4.2. Distribución genotípica y alélica del SNP G20210A del gen FII

En la Figura 26, se puede apreciar los genotipos del SNP G20210A del gen FII y su distribución en la población estudiada. Por otra parte, en la Tabla 14 se

aprecia su distribución genotípica y alélica en función del género. En la población de la presente investigación solo se encontró dos genotipos: el predominante (G/G) con un 96,43 % y el (G/A) con 3,57 %, no se observó el genotipo (A/A).

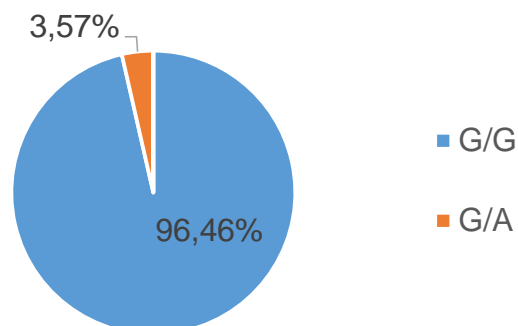


Figura 26. Distribución genotípica del SNP G20210A del gen FII.

Tabla 14.

Distribución genotípica y alélica del G20210A del gen FII considerando el género

GENOTIPOS	MUJERES (%) N=84	HOMBRES (%) N=84	TOTAL (%) = 168
G/G	81 (96,4)	81 (96,4)	162 (96,43)
G/A	3 (3,6)	3 (3,6)	6 (3,57)
A/A	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ALELOS	Mujeres (%) N=168	Hombres (%) N=168	TOTAL (%)=336
G	165 (98,21)	165 (98,21)	330 (98,21)
A	3 (1,79)	3 (1,79)	6 (1,79)
NA = NÚMERO DE ALELOS			
TOTAL A = TOTAL ALELOS			

En muchos estudios, la mayoría meta-análisis asocian al genotipo A/A de G1691A y G20210A con la muerte fetal. Esto podría explicarse por el exceso de

trombos en los vasos placentarios, el infarto de placenta y la insuficiencia uteroplacentaria secundaria. Las presencias de estas dos mutaciones podrían causar letalidad embrionaria temprana antes de que puedan ser detectadas en un feto o un recién nacido. Por lo tanto, su ausencia en el presente estudio seguramente se debe a que se trata de un genotipo deletéreo y se observa como reservorio únicamente en el heterocigoto (Arias, Romero, Joist, & Kraus, 1998; Martinelli et al., 2000; Rey E, Kahn SR, David M, & Shrier I, 2003; Rodger et al., 2010).

4.4.3. Distribución genotípica y alélica del SNP C677T del gen MTHFR

En la Figura 27, se puede apreciar los genotipos del SNP C677T del gen MTHFR y su distribución en la población estudiada. Por otra parte, en la Tabla 15 se aprecia su distribución genotípica y alélica en función del género.

Las frecuencias genotípicas para este SNP en la población fueron: (C/C) con 26,19 %, (C/T) con 51,19 % y (T/T) con 22,62 %.

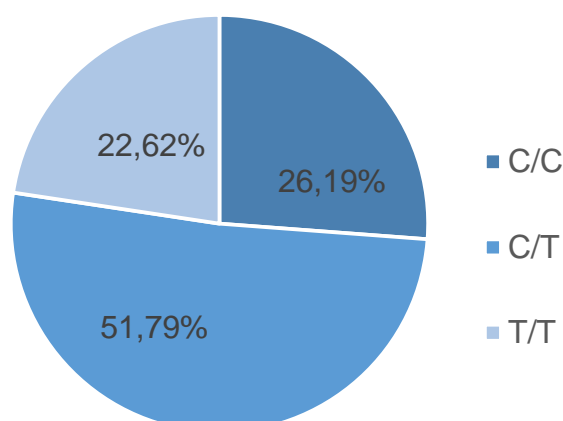


Figura 27. Distribución genotípica del SNP C677T del gen MTHFR.

Tabla 15.

Distribución genotípica y alélica del SNP C677T del gen MTHFR considerando el género

GENOTIPOS	MUJERES (%) N=84	HOMBRES (%) N=84	TOTAL (%) = 168
C/C	18 (21,4)	26 (31)	44 (26,19)
C/T	48 (57,2)	38 (45,2)	86 (51,19)
T/T	18 (21,4)	20 (23,8)	38 (22,62)
ALELOS	Mujeres (%) NA=168	Hombres (%) NA=168	TOTAL A (%)=336
C	84 (50)	90 (53,57)	174 (51,79)
T	84 (50)	78 (46,43)	162 (48,21)
NA = NÚMERO DE ALELOS TOTAL A = TOTAL ALELOS			

La MTHFR está implicada en la producción de folato, proteínas y otros compuestos importantes. Se sabe que la homocigosidad (T/T) constituye un factor de riesgo para algunas complicaciones como trombosis, espina bífida, anencefalia, e implicaciones en el tubo neural, además de otros problemas. Existe una gran diferencia en la distribución de las frecuencias de MTHFC677T en diferentes poblaciones muy posiblemente a causa de factores genéticos y ambientales (Papoutsakis et al., 2010).

En el presente estudio se puede observar que existe una heterogeneidad en la distribución de frecuencias genotípicas de este SNP, y la alta frecuencia de T/T, es casi muy similar a la de C/C. Algunos estudios sugieren que la distribución mundial de esta mutación es muy heterogénea, con una alta frecuencia del genotipo T/T en poblaciones europeas y americanas; y sugieren que la dieta rica en folato podría ser un factor causante para aquello (Yang et al., 2013).

Se conocen reportes de frecuencias altas en México y bajas en África en el genotipo T/T. También se ha observado un gradiente que aumenta de norte a sur de la prevalencia del alelo T en Europa occidental. La que ingesta de folato es más baja en el norte de Europa y en África, contrariamente a lo que sucede en países del continente americano como México que tiene una nutrición a base de cereales y frutas los cuales son una fuente rica de folato. Por lo tanto Chabi et al., 2006 sugieren que las poblaciones que mantienen una dieta rica en folato presentaran mayor prevalencia del genotipo T/T.

Estudios sugieren que la alta frecuencia de T/T en algunas poblaciones puede deberse a que este puede conferir una ventaja de supervivencia en poblaciones sanas si existe un consumo adecuado de folato en la dieta (Muñoz, Dieguez, Fernandez, Peran, & Reyes, 1998; Rosenberg et al., 2002) . El beneficio derivado de una alta ingesta dietética de folato por los portadores del genotipo T/T, puede ayudar a diversos mecanismos de fabricación de purinas y pirimidinas necesarias para la replicación del ADN, aunque esta hipótesis no está del todo establecida (Bosco et al., 2003; Ueland, Hustad, Schneede, Refsum, & Vollset, 2001).

La hipótesis de la relación de factores ambientales y la frecuencia de T/T, se menciona en un estudio realizado por Saraswathy y colaboradores (Saraswathy et al., 2008). Ellos compararon individuos con enfermedades coronarias y controles sugiriendo que los individuos con genotipo T/T (entre controles) junto con factores antropométricos y bioquímicos favorables, tienen un índice de supervivencia más alto. Por otro lado, los individuos T/T (entre los casos) están en desventaja de supervivencia por condiciones antropométricas y bioquímicas desfavorables, por lo que la selección podría estar operando en contra de este genotipo T/T entre los casos. Concluyeron que si el alelo deletéreo (T) cuenta con un ambiente óptimo y agradable en personas sanas puede alcanzar un estado de homocigosidad en el momento oportuno.

Recientemente algunos investigadores plantearon la hipótesis que la radiación ultravioleta (UV), podría influir con el patrón de distribución de C677T a través del fotólisis de folato. Siendo así que un color de piel más claro y más expuesto a la radiación UV puede ser una desventaja para los portadores del genotipo T/T, debido a su influencia adversa en el estado del folato (Yang et al., 2013).

Las hipótesis que factores ambientales como el consumo de folato y la exposición a rayos UV influyen en la distribución de C677T en diferentes poblaciones no está del todo clara. La gran heterogeneidad de esta mutación también podría deberse a otros factores como son la evolución y la migración en la historia humana o una mezcla de ambos.

4.4.4. Distribución genotípica y alélica del SNP A1298C del gen MTHFR

En la Figura 28, se puede apreciar los genotipos del SNP C677T del gen MTHFR y su distribución en la población estudiada. Por otra parte, en la Tabla 16 se aprecia su distribución genotípica y alélica en función del género.

Las frecuencias genotípicas en la población fueron: (A/A) con un 80,36 %, (A/C) con un 17,26 % y (C/C) con un 2,38 %.

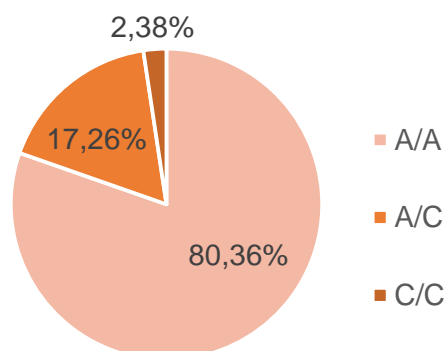


Figura 28. Distribución genotípica del SNP A1298C del gen MTHFR.

Tabla 16.

Distribución genotípica y alélica del SNP A1298C del gen MTHFR considerando el género

GENOTIPOS	MUJERES (%) N=84	HOMBRES (%) N=84	TOTAL (%) = 168
A/A	67 (79,8)	68 (81)	135 (80,36)
A/C	16 (19,0)	13 (15,4)	29 (17,26)
C/C	1 (1,2)	3 (3,6)	4 (2,38)
ALELOS	Mujeres (%) NA=168	Hombres (%) NA=168	TOTAL A (%)=336
A	150 (89,29)	149 (88,69)	299 (88,99)
C	18 (10,71)	19 (11,31)	37 (11,01)
NA = NÚMERO DE ALELOS TOTAL A = TOTAL ALELOS			

El polimorfismo A1298C está poco documentado con resultados de asociación variables en diferentes poblaciones, Varios estudios asocian la frecuencia escasa de genotipo C/C con algunas enfermedades como: arterias coronarias (CAD), enfermedades cardíacas, trombosis entre otras, al igual que el alelo 4G de PAI-1. También podría atribuirse a las diferencias en la ubicación geográfica y el origen étnico (J. Kumar et al., 2005; Sinha et al., 2010).

4.4.5. Distribución genotípica y alélica del SNP 4G/5G del gen SERPINE 1

En la Figura 29, se puede apreciar los genotipos del SNP 4G/5G del gen SERPINE 1 y su distribución en la población estudiada. Por otra parte, en la Tabla 17 se aprecia su distribución genotípica y alélica en función del género. Las frecuencias genotípicas en la población fueron: (5G/5G) con un 58,33 %, (4G/5G) con un 35,12 % y (4G/4G) con un 6,55 %.

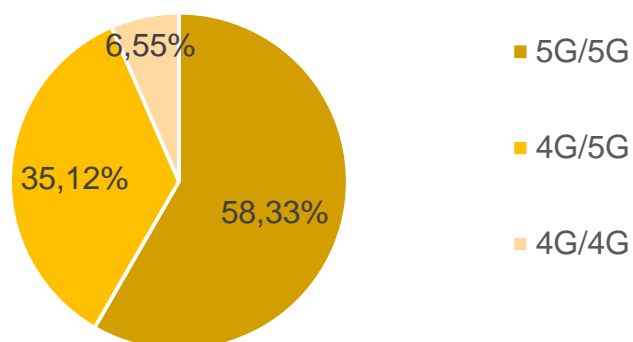


Figura 29. Distribución genotípica del SNP 4G/5G del gen SERPINE 1.

Tabla 17.

Distribución genotípica y alélica del SNP 4G/5G del gen SERPINE 1, considerando el género

GENOTIPOS	MUJERES (%) N=84	HOMBRES (%) N=84	TOTAL (%) = 168
5G/5G	55 (65,5)	43 (51,2)	98 (58,33)
4G/5G	24(28,6)	35 (41,7)	59 (35,12)
4G/4G	5 (5,9)	6 (7,1)	11 (6,55)
ALELOS	Mujeres (%) NA=168	Hombres (%) NA=168	TOTAL A (%)=336
4G	134 (79,76)	121 (72,02)	255 (75,89)
5G	34 (20,24)	47 (27,98)	81 (24,11)
NA = NÚMERO DE ALELOS TOTAL A = TOTAL ALELOS			

La frecuencia del alelo 4G en la población española es baja, igual que en la población sudamericana y ecuatoriana (Tabla 18). La frecuencia del alelo 4G obtenida en este estudio concuerda con resultados obtenidos por (Ruiz Quezada et al., 2004) (Isordia-Salas, Leaños-Miranda, Sainz, Reyes-Maldonado, & Borrayo-Sánchez, 2009) y (Roco et al., 2015), donde se ve una frecuencia escasa del alelo 4G en la población mestiza mexicana y chilena, la cual es una mezcla de étnicas indígena, negra y española. Por lo que, estos autores sugieren que la escasez de este alelo en poblaciones mestizas pudo deberse a que esta fue una herencia de la población que colonizó o se introdujo en la zona.

El alelo 4G del polimorfismo PAI-1 y el alelo C de MTHFRA 1298C son escasos en este estudio posiblemente a que estos están relacionados con varias enfermedades y a la herencia genética de la población caucásica española.

4.5. Comparación de frecuencias obtenidas con otras poblaciones

En la Tabla 18 se puede apreciar las frecuencias alélicas de los 5 SNP'S en la población ecuatoriana, sudamericana, población caucásica (España), asiática (Japón) y africana.

Tabla 18.

Frecuencia alélica de los 5 polimorfismos estudiados en la población ecuatoriana, sudamericana, española, japonesa y africana

SNP	Ecuador (este estudio)	Chile	Argentina	Brasil	Colom	Venez	Espa	Japón	África
FV	n=168	n=146	n=418	n=275	n=144	n=51	n=493	n=93	n=642
G	0,99	0,97	0,985	0,995	0,996	0,992	0,990	1,00	0,99
A	0,01	0,03	0,015	0,006	0,004	0,008	0,010	0,00	0,01

FII	n=168	n=146	n=418	n=275	n=144	n=51	n=493	n=93	n=2,354
G	0,98	0,97	0,987	0,982	1,00	1,00	0,974	1,00	0,97
A	0,02	0,03	0,013	0,018	0,00	0,00	0,026	0,00	0,03
MTH FRC 677T	n=168	n=146	n=112	n=843	n=206	n=50	n=200	n=164	n=425
C	0,52	0,52	0,652	0,77	0,65	0,77	0,59	0,58	0,91
T	0,48	0,48	0,348	0,23	0,35	0,33	0,41	0,42	0,090
MTH FRA 1298 C	n=168	n=105	ND	n=45	ND	ND	n=52	n=80	n=425
A	0,89	0,79	ND	0,77	ND	ND	0,63	0,84	0,86
C	0,11	0,21	ND	0,23	ND	ND	0,37	0,16	0,14
PAI- 1 (4G/ 5G)	n=168	n=146	n=40	n=144	ND	ND	n=127	n=94	n=1,795
5G	0,76	0,62	0,575	0,54	ND	ND	0,71	0,37	0,85
4G	0,24	0,38	0,425	0,46	ND	ND	0,28	0,63	0,15
Argen: Argentina Colom: Colombia Venez: Venezuela Espa= España n = Tamaño de muestra ND = No Datos									

Adaptado de Roco et al. (2015).

Se puede apreciar que las frecuencias de estos 5 SNP'S de este estudio (Ecuador), son muy parecidas a las frecuencias sudamericanas (Chile-Argentina-Brasil-Colombia-Venezuela), y a la población caucásica española. Esto puede deberse al origen de los 5 SNP'S debido a que las poblaciones sudamericanas son el resultado de una mezcla entre las poblaciones aborígenes de cada región y caucásicas (Reich et al., 2012).

Estudios demuestran que los SNP'S FV y FII surgieron hace aproximadamente de 21,000 – 34,000 años posiblemente por deriva génica o selección natural, y podrían haber conferido a las mujeres y hombres pre-neolíticos ventajas,

seguramente confiriendo un riesgo reducido al sangrado (Bauduer & Lacombe, 2005).

En el caso de las mujeres pudo haberlas protegido de sangrados excesivos en el momento del parto y la menstruación y a los hombres de aquella época para controlar el sangrado después de las luchas con animales y otros hombres. Además se sabe que el hombre de aquella época era delgado y físicamente activo por lo que la trombosis no era un problema (Franchini & Mannucci, 2008) (Zivelin et al., 2016).

Las mutaciones FV y FII parecen tener un origen único en Oriente Medio y su extensión se dio por la expansión neolítica hacia la India y Europa. Las frecuencias latinoamericanas estarían relacionadas con los flujos migratorios originarios de Europa meridional que se dieron a partir de finales del siglo XV (Francès et al., 2006; Franchini & Mannucci, 2008; Zivelin et al., 2016).

En cuanto a los SNP'S C677T y A1298C del gen MTHFR por su amplia distribución se cree tienen un origen multicéntrico (Zetterberg et al., 2002). Sin embargo Rosenberg y colaboradores (Rosenberg et al., 2002) postularon que A1298C y C677T son alteraciones que ocurrieron gracias a un haplotipo fundador. Llegaron a este postulado porque detectaron el haplotipo GTAC en tres poblaciones distantes (israelitas, japoneses y africanos de Ghana). Se puede asumir entonces que las mutaciones en MTHFR, muy posiblemente tienen un origen ancestral (haplotipo fundador), porque se ha encontrado en distintas poblaciones y el genotipo T/T posiblemente confiere una ventaja de supervivencia en poblaciones con un consumo adecuado de ácido fólico, explicando así variabilidad observada en diferentes poblaciones.

En la Tabla 18, se puede observar que el genotipo C/C del polimorfismo C677T es menos prevalente en la población africana, contrariamente a lo que se ve en este estudio y en sudamericana donde la frecuencia del alelo T no tiene mucha diferencia con el alelo C. Esto podría explicarse por la ventaja evolutiva que

puede conferir esta mutación en poblaciones con buena ingesta de folato, lo cual no se ve en África, pero si en población sudamericana, donde la dieta es rica en cereales, frutas y verduras (Chabi et al., 2006).

4.6. Equilibrio de Hardy Weinberg

El Equilibrio de Hardy Weinberg se llevó a cabo usando el *software* Arlequín V3.2 con un nivel de significancia de 0,005 gracias al ajuste de corrección de Bonferroni ($p = \frac{0,05}{10}$). En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 19.

Resultados de la prueba de Fisher en programa Arlequín para la determinación de Hardy – Weinberg con un $\alpha = 0,005$.

Genotipo	Heterocigosidad Observada	Heterocigosidad Esperada	Valores de p
G1691A	0,01786	0,01775	1,00000
G20210A	0,03571	0,03518	1,00000
A1298C	0,17262	0,19657	0,11631
C677T	0,51190	0,50085	0,87657
PAI-1	0,33333	0,37008	0,21491

Los 5 SNP presentan un valor de p mayor a 0,005, por lo tanto se puede asumir que la población estudiada se encuentra en el equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto puede deberse a que la población no ha sido expuesta a fuerzas evolutivas que puedan producir cambios en la variabilidad genética, y esta se mantiene a lo largo de generaciones. Las fuerzas evolutivas que posiblemente esta población experimentó y llevaron al equilibrio de Hardy- Weinberg, fueron: que la población en estudio es grande y los apareamientos son aleatorios, no existe selección y la tasa de mutación de *novo* es inapreciable. No existió una inmigración significativa reciente de individuos provenientes de una población con frecuencias alélicas distintas a la población en estudio, muy posiblemente en

algún momento la población debió presentar un desequilibrio gracias a la inmigración de caucásicos por la colonización, pero probablemente las frecuencias se estabilizaron a lo largo de las generaciones resultando en las frecuencias actuales, reflejando el equilibrio encontrado (Nussbaum, McInnes, & Willard, 2016 pp. 155-170). Este resultado, tiene concordancia con otros estudios de frecuencias de estos mismos SNP'S, llevados en Sudamérica, Europa, Asia y África, donde también se observa que dichas poblaciones están en equilibrio (Genoud et al., 2000; H. et al., 2008; Pestana et al., 2009; Roco et al., 2015; Torres et al., 2006).

Se sabe que los SNP'S tienen una herencia en bloque (se heredan juntos), si tienen una distancia física cercana (generalmente < 50 kilobases [kb]), produciendo un desequilibrio de ligamiento fuerte (Pardo & Miller, 2018 pp 71-91). Sin embargo, no existe un desequilibrio de ligamiento entre los SNP'S del gen MTHF: C677T y A1298C (Figura 30), a pesar de su corta distancia física (2,1kb).

Algunos autores sugieren que si existe un desequilibrio de ligamiento completo entre estos dos SNP'S, debido a la inexistencia de sujetos vivos con cuatro mutaciones (677TT/1298CC) y existe un número muy bajo con tres mutaciones (677T/1298AC y 677CT/1298CC) y en tejido de fetos de aborto espontaneo de diferentes poblaciones. Además sugieren que este desequilibrio puede deberse a que la mayoría de estudios que examinan estas mutaciones las han identificado solo en posiciones *trans* (Stegmann et al., 1999) (Zetterberg et al., 2002).

Isolato y colaboradores (Isolato & Donnelly, 2000) calcularon la frecuencia de casos (trombosis venosa) y controles, y encontraron un genotipo (C677TT /1298AC), y postuló que este cruce no es un evento raro como se creía anteriormente pues contribuye a la segregación independiente. Además, postula que pudo deberse a que las mutaciones analizadas pueden ocurrir en regiones *cis* y *trans* del gen MTHFR. En la Figura 30, se aprecia la Tabla arrojada por el

programa arlequín, donde se puede apreciar el desequilibrio de ligamiento de los 5 SNP'S.

Locus	#	0	1	2	3	4
0		*	-	-	-	-
1		-	*	-	-	-
2		-	-	*	-	-
3		-	-	-	*	-
4		-	-	-	-	*

Figura 30. Tabla de desequilibrio de ligamiento, del programa arlequín con un nivel de significancia 0,0500.

a) los números representa a los 5 SNP.

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

Las frecuencias alélicas de los 5 polimorfismos estudiados tienen similitud con la frecuencia de las poblaciones sudamericanas y caucásicas (españolas), esto podría ser explicado por el proceso de mestizaje colonial.

En los individuos de estudio se identificó la ausencia del genotipo A/A correspondiente al SNP G1691A (FV de Leiden) y A/A correspondiente al SNP G20210A (FII Protrombina), debido a que probablemente estos alelos son deletéreos.

El genotipo T/T, del polimorfismo MTHFR C677T es muy frecuente en la población de estudio, esto podría deberse a factores genéticos y ambientales influyentes en la población.

5.2. Recomendaciones

Llevar futuras investigaciones de tipo caso control de estos 5 polimorfismos en Ecuador, para evaluar la variabilidad genética entre diferentes etnias.

Se recomienda ampliar la investigación, con estudios de ancestría para corroborar que la población de estudio posee etnia mestiza.

Se recomienda ampliar la investigación con poblaciones afroecuatorianas e indígenas para obtener datos más acertados del origen de estos SNP's en los diferentes grupos humanos ecuatorianos.

Realizar estudios adicionales que incluyan factores genéticos, nutricionales, ambientales y demográficos que afectan el polimorfismo C677T para explicar su patrón de distribución en Ecuador.

A nivel clínico, se recomienda el uso de estos datos para la creación de un panel genético enfocado para población mestiza sudamericana.

REFERENCIAS

- Almawi, W. Y., Ameen, G., Tamim, H., Finan, R. R., & Irani-Hakime, N. (2004). *Factor V G1691A, Prothrombin G20210A, and Methylenetetrahydrofolate Reductase [MTHFR] C677T Gene Polymorphism in Angiographically Coronary Artery Disease. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 17(3), 199–205.* Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://doi.org/10.1023/B:THRO.0000040489.86029.27>
- Álvarez Sala Walther, J. L., Casan Clara, P., Rodríguez De Castro, F., Rodríguez Hermosa, J. L., & Villena Garrido, V. (2017). Enfermedad tromboembólica venosa : etiología , patogenia , manifestaciones clínicas y diagnóstico. In *Neumonología Clínica* (Second Edi, pp. 406–414). Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://doi.org/10.1016/B978-84-9022-443-4/00049-8>
- Andrew, M. (1995). *Developmental hemostasis: Relevance to hemostatic problems during childhood. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 21(4), 341–356.* Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://doi.org/10.1055/s-2007-1000655>
- Arias, F., Romero, R., Joist, H., & Kraus, F. T. (1998). *Thrombophilia: A mechanism of disease in women with adverse pregnancy outcome and thrombotic lesions in the placenta. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, 7(6), 277–286.* Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://doi.org/10.3109/14767059809020459>
- Aryal, S. (2018). PCR. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://microbiologyinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-procedure-types-applications-and-animation/>
- Avery, O. T., Colin M, M., & McCarty, M. (1944). *STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES: INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. Journal of Experimental Medicine, 79(2),*

137–158. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de:<https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137>

- Banco Nacional de ADN. (2010). ADN de pureza óptima ADN pureza aceptable presencia de compuestos aromáticos contaminación con ARN. 2–7. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: bancoadn.org
- Bauduer, F., & Lacombe, D. (2005). *Factor V Leiden, prothrombin 20210A, methylenetetrahydrofolate reductase 677T, and population genetics. Molecular Genetics and Metabolism*, 86(1–2), 91–99. Recuperado el 17 de febrero de 2018 de:<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.04.002>
- Berndt, M. C., Metharom, P., & Andrews, R. K. (2014). *Primary haemostasis: Newer insights. Haemophilia*, 20(S4), 15–22. Recuperado el 17 de febrero de 2018 de:<https://doi.org/10.1111/hae.12427>
- Bertina, R., Koeleman, B., & Koster, T. (1995). *High Risk of Thrombosis in Patients Homozygous for Factor V Leiden (Activated Protein C Resistance). Blood*, 85, 1504–1508.
- Bertina, R. M., van Tilburg, N. H., de Fouw, N. J., & Haverkate, F. (1992). *Thrombin, a link between coagulation activation and fibrinolysis. Annals of the New York Academy of Sciences*, 667(1), 239–248. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1309042>
- Biswas, B. (2016). *Clinical Performance Evaluation of Molecular Diagnostic Tests. Journal of Molecular Diagnostics*, 18(6), 803–812. Recuperado el 17 de febrero de 2018 de:<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.06.008>
- Borstnar, C. R., & López, F. C. (2016). Diagnóstico y asesoramiento genético. In *Medicina Interna* (18th Editi, pp. 1203–1205). Recuperado el 17 de febrero de 2018 de: <https://doi.org/10.1016/B978-84-9022-996-5/00151-4>
- Bosco, P., Guéant-Rodriguez, R. M., Anello, G., Barone, C., Namour, F., Caraci, F., Guéant, J. L. (2003). *Methionine synthase (MTR) 2756 (A→G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with down syndrome. American Journal of Medical Genetics*, 121 A(3), 219–224.

Recuperado el 17 de febrero de 2018 de:<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.20234>

- Brustolin, S., Giugliani, R., & Félix, T. M. (2010). *Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(1), 1–7. Recuperado el 6 de Mayo de 2018 de:<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009007500021>
- Carson, S., Miller, H. B., & Witherow, D. S. (2012). *PCR Amplification of egfp and Completion of Vector Preparation. Molecular Biology Techniques*, 21–29. Recuperado el 27 de febrero de 2019 de:<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385544-2.00003-x>
- Chabi, N. W., Sanni, A., Anello, G., Bosco, P., RomaNo. C., Amouzou, E., ... Sa, B. E. (2006). *alleles and folate status: a comparative study in Mexican , West. American Journal of Clinical Nutrition*, 83(May), 701–707.
- Chango, A, Boisson, F., Barbé, F., Quilliot, D., Droesch, S., Pfister, M., ... Nicolas, J. P. (2000). *The effect of 677C-->T and 1298A-->C mutations on plasma homocysteine and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. The British Journal of Nutrition*, 83(6), 593–596. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10911766>
- Chango, Abalo, Fillon-Emery, N., Mircher, C., Bléhaut, H., Lambert, D., Herbeth, B., ... Nicolas, J. P. (2005). *No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. The British Journal of Nutrition*, 94(2), 166–169. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115349>
- Colwell, J. A. (2004). *Antiplatelet agents for the prevention of cardiovascular disease in diabetes mellitus. American Journal of Cardiovascular Drugs*, 4(2), 87–106. Recuperado el 27 de febrero de 2019 de: <https://doi.org/10.2165/00129784-200404020-00003>
- Cripe, L. D., Moore, K. D., & Kane, W. H. (1992). *Structure of the gene for human coagulation factor V. Biochemistry*, 31(15), 3777–3785. Recuperado el 27 de febrero de 2019 de:<https://doi.org/10.1021/bi00130a007>

- Cross, S. S. (2019). *What causes disease? In What causes disease? Underwood's Pathology a clinical approach* (Seventh Ed, pp. 27–52). Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://www-clinicalkey-es.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/#!/content/book/3-s2.0-B9780702072123000037?scrollTo=%23hl0001809>
- Crowther, M. A., & Kelton, J. G. (2003). *Review Congenital Thrombophilic States Associated with Venous Thrombosis: OF THE. Annals of Internal Medicine, 138.*
- Cruz, A., & Espinosa, F. (2007). Fisiopatología de la trombosis. *Gaceta Medica de Mexico, 143*(SUPPL. 1), 11–14.
- Dahlbäck, B. (2008). *ASH 50th anniversary review Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. Blood, 112*(1), 19–27. Recuperado el 27 de febrero de 2019 de: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-077909>.
- Dahm, R. (2005). *Friedrich Miescher and the discovery of DNA. Developmental Biology, 278*(2), 274–288. Recuperado el 27 de febrero de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.028>
- Daiger, S. P., Sullivan, L. S., & Bowne, S. J. (2013). *Genetic Mechanisms of Retinal Disease. In Retina* (Sixth Edit, Vol. 1, pp. 624–634). Recuperado el 27 de febrero de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0737-9.00031-X>
- Dang, O. D., Vindigni, A., & Di Cera, E. (1995). *An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92*(13), 5977–5981. Recuperado el 27 de febrero de 2019 de: <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.5977>
- Davis, P. J., & Cladis, F. (2017). *Hematology and Coagulation Disorders. In Smith's Anesthesia for Infants and Children* (Ninth Edit). Recuperado el 18 de abril de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-34125-7.00047-4>
- Douglas, M., Zipes, D., Libby, P., & Bonow, R. (2015). *TRATADO DE CARDIOLOGÍA. España.*

- Duviz. (2019). Durviz. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: 2019 website: <https://durviz.com/producto/real-pure-spin-blood-kit/>
- Esmon, C. T. (2000). *Regulation of blood coagulation. Biochimica et Biophysica Acta*, 1477(1–2), 349–360. Recuperado el 18 de abril de 2019 de: [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00266-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00266-6)
- Excoffier, L., & Lischer, H. (2010). *software Arlequín V3.2* (pp. 564–567). pp. 564–567.
- Francès, F., Portolès, O., Gabriel, F., Corella, D., Sorlí, J. V., Sabater, A., ... Guillén, M. (2006). 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 Medica de Chile*, 134(1), 13–20.
- Franchini, M., & Mannucci, P. M. (2008). *The hemostatic balance revisited through the lessons of mankind evolution. Internal and Emergency Medicine*, 3(1), 3–8. Recuperado el 18 de abril de 2019 de: <https://doi.org/10.1007/s11739-008-0100-z>
- Francis, C. W. (2002). *Plasminogen activator inhibitor-1 levels and polymorphisms. Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 126(11), 1401–1404. Recuperado el 18 de abril de 2019 de: [https://doi.org/10.1043/0003-9985\(2002\)126<1401:PAILAP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-9985(2002)126<1401:PAILAP>2.0.CO;2)
- Friedman, G., Goldschmidt, N., Friedlander, Y., Ben-Yehuda, A., Selhub, J., Babaey, S., Bar-On, H. (1999). *A Common Mutation A1298C in Human Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: Association with Plasma Total Homocysteine and Folate Concentrations. The Journal of Nutrition*, 129(9), 1656–1661. Recuperado el 18 de abril de 2019 de: <https://doi.org/10.1093/jn/129.9.1656>
- Friso, S., Girelli, D., Trabetti, E., Stranieri, C., Olivieri, O., Tinazzi, E., ... Corrocher, R. (2002). *A1298C methylenetetrahydrofolate reductase mutation and coronary artery disease: relationships with C677T polymorphism and homocysteine/folate metabolism. Clinical and Experimental Medicine*, 2(1), 7–12. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12049191>

- Froehlich, T., & Geulen, O. (2008). *Hybridization Probe Pairs and Single-Labeled Probes: an Alternative Approach for Genotyping and Quantification*. 429, 117–133. Recuperado el 18 de abril de 2019 de: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-040-3_9
- Genetics Home Reference. (2018a). *Complete plasminogen activator inhibitor 1 deficiency*. Recuperado el 18 de abril de 2019 de: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/complete-plasminogen-activator-inhibitor-1-deficiency#resources>
- Genetics Home Reference. (2018b). *MTHFR gene, methylenetetrahydrofolate reductase*. Recuperado el 18 de abril de 2019 de: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR#sourcesforpage>
- Genoud, V., Castanon, M., Annichino-Bizzacchi, J., Korin, J., & Kordich, L. (2000). *Prevalence of three prothrombotic polymorphisms. Factor V G1691A, factor II G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C 677T in Argentina. On behalf of the Grupo Cooperativo Argentino de Hemostasia y Trombosis. Thrombosis Research, 100(3), 127–131.*
- Ginzinger, D. G. (2002). *Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Experimental Hematology, 30(6), 503–512.* Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12063017>
- Gleason, C. A., & Juul, S. E. (2019). Genoma humano y asistencia neonatal. In Avery. *Enfermedades del recién nacido (Tenth Edit, Vol. 17, pp. 180–189)*. Recuperado el 18 de abril de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/B978-84-9113-388-9/00017-9>
- Gohil, R., Peck, G., & Sharma, P. (2009). *The genetics of venous thromboembolism: A meta-analysis involving ~120,000 cases and 180,000 controls. Thrombosis and Haemostasis, 102(2), 360–370.* Recuperado el 18 de abril de 2019 de: <https://doi.org/10.1160/TH09-01-0013>
- H., T., C., D., V., G., F., L., A., M., P., Y., L., K. (2008). *Plasminogen activator inhibitor-1 activity and 4G/5G polymorphism in hemodialysis. Journal of*

- Vascular Access*, 9(2), 142–147. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L352172014>
- Hanson, N. Q., Aras, O., Yang, F., & Tsai, M. Y. (2001). *C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease*. *Clinical Chemistry*, 47(4), 661–666. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274015>
- Hoagland, M. B. (1959). *Nucleic Acids and Proteins*. *Scientific American*, 201(6), 55–61. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1259-55>
- Hopper, J. L., Bishop, D. T., & Easton, D. F. (2005). *Population-based family studies in genetic epidemiology*. *The Lancet*, 366(9494), 1397–1406. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67570-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67570-8)
- Huber, K., Christ, G., Wojta, J., & Gulba, D. (2001). *Plasminogen activator inhibitor type-1 in cardiovascular disease*. Status report 2001. *Thrombosis Research*, 103 Suppl, S7-19. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(01\)00293-6](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(01)00293-6)
- Hunter, D., & Fineberg, H. (2014). *Convergence to Common Purpose in Global Health*. *New England Journal of Medicine*, 370(18), 1751–1753. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1056/NEJMe1402676>
- Inoue, S. (2007). *Pharmacogenetic study of methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase in Japanese and assessment of ethnic and gender differences*. 8, 41–47.
- International Society on Thrombosis and Haemostasis. (2017). Día Mundial de la Trombosis. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <http://es.worldthrombosisday.org/disclaimer/>
- Isetti, G., & Maurer, M. C. (2007). *Employing mutants to study thrombin residues responsible for factor XIII activation peptide recognition: A kinetic study*. *Biochemistry*, 46(9), 2444–2452. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1021/bi0622120>

- Isolato, P., & Donnelly, J. G. (2000). *Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase mutations in patients with venous thrombosis. Molecular Diagnosis, 5*(1), 59–66. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: [https://doi.org/10.1016/S1084-8592\(00\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S1084-8592(00)00012-6)
- Isordia-Salas, I., Leños-Miranda, A., Sainz, I. M., Reyes-Maldonado, E., & Borrayo-Sánchez, G. (2009). Asociación entre el polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y el infarto agudo de miocardio con elevación del ST en pacientes jóvenes. *Revista Española de Cardiología, 62*(4), 365–372. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: [https://doi.org/10.1016/S0300-8932\(09\)70893-0](https://doi.org/10.1016/S0300-8932(09)70893-0)
- Jesús, S. M., & Fermín, G. (2015). Fisiopatología de la coagulación. In *HEMATOLOGÍA* (cuarta, pp. 201–214). Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://clinicalkeymeded.elsevier.com/#/books/9788490228616/cfi/6/2!/4/4/2/2@0:0.00>
- Kalafatis, M., Rand, M. D., & Mann, K. G. (1994). *The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. The Journal of Biological Chemistry, 269*(50), 31869–31880. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989361>
- Khan, S., & Dickerman, J. D. (2006). *Hereditary thrombophilia. Thrombosis Journal, 4*, 1–17. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1186/1477-9560-4-15>
- Kliegman, R. M., St Geme, J. W., Blum, N., Shah, S. S., Tasker, R. C., & Wilson, K. M. (2019). *Hemorrhagic and Thrombotic Diseases. In Nelson Textbook of Pediatrics, 2-Volume Set (Twenty-Fir)*. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52950-1.00502-2>
- Kliegman, R. M., Stanton, B. F., Geme, J., Schor, N., & Behrman, R. (2016). Hemostasia. In *Tratado de Pediatría* (20th ed., pp. 2487–2492). Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://www-clinicalkey-com.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/student/content/book/3-s2.0-B9788491130154004755>
- Kliegman, R. M., Stanton, B. F., St Geme, J. W., Schor, N. F., & Behrman, R. E.

- (2006). Predisposición hereditaria a la trombosis. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/B978-84-9113-015-4/00478-0>
- Krypuy, M., Newnham, G. M., Thomas, D. M., Conron, M., & Dobrovic, A. (2006). *High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. BMC Cancer, 6*, 1–12. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-295>
- Kumar, J., Das, S. K., Sharma, P., Karthikeyan, G., Ramakrishnan, L., & Sengupta, S. (2005). *Homocysteine levels are associated with MTHFR A1298C polymorphism in Indian population. Journal Of Human Genetics, 50*, 655. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://doi.org/10.1007/s10038-005-0313-1>
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2015). Trastornos hemodinámicos, enfermedad tromboembólica y shock. In *Pathologic Basis of Disease* (novena, pp. 113–135). Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://www-clinicalkey-com.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/student/content/book/3-s2.0-B9788490228784500107>
- Lane, D. A., & Grant, P. J. (2000). *Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. Blood, 95*(5), 1517–1532. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10688804>
- Lecumberri, R., & Rodríguez, P. (2018). Hematología clínica. In *Balcells. La clínica y el laboratorio* (pp. 1–20). Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/B978-84-458-2585-3/00001-4>
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., ... Murray, C. J. L. (2012). *Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. The Lancet, 380*(9859), 2095–2128. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)
- Lyon, E., & Wittwer, C. T. (2009). *LightCycler technology in molecular*

- diagnostics. Journal of Molecular Diagnostics*, 11(2), 93–101. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2009.080094>
- Margaglione, M., Brancaccio, V., De Lucia, D., Martinelli, I., Ciampa, A., Grandone, E., & Di MinNo. G. (2000). *Inherited Thrombophilic Risk Factors and Venous Thromboembolism. Chest*, 118(5), 1405–1411. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1378/chest.118.5.1405>
- Margaglione, M., Cappucci, G., D'Addetta, M., Colaizzo, D., Giuliani, N., Vecchione, G., Di MinNo. G. (1998). *PAI-1 plasma levels in a general population without clinical evidence of atherosclerosis: relation to environmental and genetic determinants. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(4), 562–567. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.18.4.562>
- Martinelli, I., Bucciarelli, P., & Mannucci, P. M. (2010). Thrombotic risk factors: Basic pathophysiology. *Critical Care Medicine*, 38(SUPPL. 2). Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181c9cbd9>
- Martinelli, I., Taioli, M., Cetin, R., Marinoni, A., Gerosa, S., Villa, M., ... Mannucci, P. (2000). *Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss*. 343, 1015–1018.
- Moll, S., & Varga, E. A. (2015). *Homocysteine and MTHFR Mutations. Circulation*, 132(1), e6-9. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013311>
- MONTO, R. W. (1952). *ESSENTIAL THROMBOPHILIA. Archives of Internal Medicine*, 90(1), 54. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1001/archinte.1952.00240070060006>
- Montufar, S., Calero, C., Vinueza, R., Correa, P., Carrera-Gonzalez, A., Villegas, F., ... Paredes, R. (2017). *Association between the APOE ε 4 Allele and Late-Onset Alzheimer's Disease in an Ecuadorian Mestizo Population. International Journal of Alzheimer's Disease*, 2017. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1155/2017/1059678>

- Mullis, K. B. (1990). *The unusual origin of the polymerase chain reaction*. *Scientific American*, 262(4), 56–65. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- Muñoz, E., Dieguez, J. L., Fernandez, N., Peran, S., & Reyes, A. (1998). *Genetic selection and folate intake during pregnancy*. *The Lancet*, 352(9134), 1120–1121. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)79761-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)79761-0)
- National Center for Biotechnology Information. (2018a). Factor V (*Homo sapiens*).
- National Center for Biotechnology Information. (2018b). MTHFR methylenetetrahydrofolate reductase. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4524>
- National Center for Biotechnology Information. (2018c). *SERPINE1 serpin family E member 1 [Homo sapiens (human)]*. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5054>
- National Human Genome Research Institute. (2011). *Learning About Factor V Leiden Thrombophilia*. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://www.genome.gov/15015167/learning-about-factor-v-leiden-thrombophilia/>
- Nordhem, A., & Wiman, B. (1997). *Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) content in platelets from healthy individuals genotyped for the 4G/5G polymorphism in the PAI-1 gene*. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 57(5), 453–461. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9279972>
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., & Willard, H. F. (2016a). *Genetic Variation in Populations*. In *Thompson & Thompson Genetics in Medicine* (pp. 155–170). Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://www-clinicalkey-es.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/#!/content/book/3-s2.0-B9781437706963000091?scrollTo=%23hl0000776>
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., & Willard, H. F. (2016b). *Introduction to the Human Genome*. In *Thompson & Thompson Genetics in Medicine* (pp. 3–20). Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://www-clinicalkey->

es.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/#!/content/book/3-s2.0-B9781437706963000029?scrollTo=%23hl0000243

- Orkin, S., Fisher, D., Ginsburg, D., Mira, T., Lux, S., & Nathan, D. (n.d.). *HEMATOLOGY AND ONCOLOGY OF INFANCY AND CHILDHOOD*.
- Papoutsakis, C., Manios, Y., Magkos, F., Papaconstantinou, E., Schulpis, K. H., Zampelas, A., Yiannakouris, N. (2010). *Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 677C>T) polymorphism on plasma homocysteine concentrations in healthy children is influenced by consumption of folate-fortified foods. Nutrition, 26(10), 969–974.* Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.09.022>
- Pardo, M., & Miller, R. (2018). *Hemostasis* (Seventh Ed). Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40115-9.00022-0>
- Paz-y-Miño. C. (2016). Frecuencia del polimorfismo Ile462Val CYP1A1 en individuos de la población ecuatoriana afectados con cáncer de mama. (December 2010).
- Paz-y-Miño, C., Muñoz, M. J., López-Cortés, A., Cabrera, A., Palacios, A., Castro, B., Sánchez, M. E. (2010). *Frequency of polymorphisms pro198leu in GPX-1 gene and ile58thr in MnSOD gene in the altitude Ecuadorian population with bladder cancer. Oncology Research, 18(8), 395–400.* Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.3727/096504010X12644422320780>
- Pepe, G., Rickards, O., Vanegas, O. C., Brunelli, T., Gori, A. M., Giusti, B., ... Abbate, R. (1997). *Prevalence of factor V Leiden mutation in non-European populations. Thrombosis and Haemostasis, 77(2), 329–331.* Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1055/s-0038-1655963>
- Pestana, C. I., Torres, A., Blanco, S., Rojas, M. J., Méndez, C., López, J. L., ... Porco, A. (2009). *Factor V Leiden and the Risk of Venous Thrombosis, Myocardial Infarction, and Stroke: A Case–Control Study in Venezuela. Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 13(4), 537–542.* Recuperado

- el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1089/gtmb.2008.0100>
- Reich, D., Patterson, N., Campbell, D., Tandon, A., Mazieres, S., Ray, N., ... Ruiz-Linares, A. (2012). *Reconstructing Native American population history. Nature, 488*(7411), 370–374. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1038/nature11258>
- Reverter, J. C., & Vicente, V. (2016). *Enfermedades de la Hemostasia*. 1691–1719.
- Rey E, Kahn SR, David M, & Shrier I. (2003). *Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. Lancet, 361*(9361), 901–908.
- Ridker, P., Miletich, J., Hennekens, C., & Buring, J. (1997). *Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women*. Implications for venous thromboembolism screening. *Jama, 277*, 1305–1307. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1001/jama.277.16.1305>
- Roche. (2012). High Pure PCR Template Preparation Kit. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11796828001_en_09.pdf
- Roco, A., Quiñones, L. A., Sepúlveda, P., Donoso, H., Lapostol, C., Alarcón, R., ... Acevedo, C. (2015). *Prevalence of seven cardiovascular-related genetic polymorphisms in a chilean mestizo healthy population. Acta Cardiologica, 70*(5), 528–535. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.2143/AC.70.5.3110513>
- Rodger, M. A., Betancourt, M. T., Clark, P., Lindqvist, P. G., Dizon-Townson, D., Said, J., ... Greer, I. A. (2010). *The association of factor V leiden and prothrombin gene mutation and placenta-mediated pregnancy complications: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. PLoS Medicine, 7*(6). Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000292>
- Rosenberg, N., Murata, M., Ikeda, Y., Opare-Sem, O., Zivelin, A., Geffen, E., & Seligsohn, U. (2002). *The Frequent 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism Is Associated with a Common Haplotype in Whites, Japanese, and Africans. The American Journal of*

- Human Genetics*, 70(3), 758–762. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1086/338932>
- Rosendaal, F. R. (2005). *Venous Thrombosis: The Role of Genes, Environment, and Behavior*. *Hematology*, 2005(1), 1–12. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2005.1.1>
- Rosing, J., Hemker, H. C., & Tans, G. (1998). *Molecular biology and pathophysiology of APC resistance: Current insights and clinical implications*. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 24(4), 329–335. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1055/s-2007-996021>
- Royle, N. J., Irwin, D. M., Koschinsky, M. L., Macgillivray, R. T. A., & Hamerton, J. L. (1987). *Human Genes Encoding Prothrombin and Ceruloplasmin Map to 1 p11-q12 and 3q21-24, Respectively*. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 13(3), 285–292.
- Rozman Borstnar, C., & Cardellach López, F. (2016a). Enfermedades de la hemostasia. In *Medicina Interna* (18th Editi, pp. 1691–1719). Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/B978-84-9022-996-5/00209-X>
- Rozman Borstnar, C., & Cardellach López, F. (2016b). Genoma humano: métodos de análisis. In *Medicina Interna* (Decimoctav, pp. 1130–1138). Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://www-clinicalkey-com.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/student/content/toc/3-s2.0-C20151017483>
- Ruiz Quezada, S., Vázquez Del Mercado, M., Parra Rojas, I., Rangel Villalobos, H., Best Aguilera, C., Sánchez Orozco, L. V., & Muñoz Valle, J. F. (2004). *Genotype and allele frequency of PAI-1 promoter polymorphism in healthy subjects from the west of Mexico. Association with biochemical and hematological parameters*. *Annales de Genetique*, 47(2), 155–162. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.anngen.2003.12.001>
- Saraswathy, K. N., Mukhopadhyay, R., Sinha, E., Aggarwal, S., Sachdeva, M. P., & Kalla, A. K. (2008). *Hematology: Basic Principles and Practice*. In

- American Journal of Human Biology* (Vol. 20, pp. 116–117). Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1002/ajhb.20682>
- Schafer, A. I. (2003). *Thrombotic Disorders: Diagnosis and Treatment. Hematology*, 2003(1), 520–539. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2003.1.520>
- Schwartz, R. (2018). Deficiencia de factor II. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: <https://emedicine.medscape.com/article/209742-overview>
- Segers, K., Dahlbäck, B., Bock, P. E., Tans, G., Rosing, J., & Nicolaes, G. A. F. (2007). *The role of thrombin exosites I and II in the activation of human coagulation factor V. Journal of Biological Chemistry*, 282(47), 33915–33924. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1074/jbc.M701123200>
- Shukla, A. K. (2013). *Sample Processing and cDNA Preparation for Microbial Metatranscriptomics in Complex Soil Communities*. In *Methods in Enzymology* (pp. 251–267). Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407863-5.00013-7>
- Sidawy, A. N., & Perler, B. A. (2018). *Hypercoagulable States. In Rutherford's Vascular Surgery and Endovascular Therapy, 2-Volume Set* (Ninth Edit). Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42791-3.00038-4>
- Simioni, P., Tormene, D., Spiezia, L., Tognin, G., Rossetto, V., Radu, C., & Prandoni, P. (2006). *Inherited thrombophilia and venous thromboembolism. Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 32(7), 700–708. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1055/s-2006-951298>
- Sinha, E., Walia, G. K., Mukhopadhyay, R., Samtani, R., Gupta, B. P., Ghosh, P. K., & Saraswathy, K. N. (2010). *Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism: An independent risk determinant of coronary heart disease in an endogamous population from Delhi (India). E-SPEN*, 5(5), e213–e218. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.eclnm.2010.07.005>
- Sofi, F., Lari, B., RogoliNo. A., Marcucci, R., Pratesi, G., Dorigo, W., ... Prisco,

- D. (2005). *Thrombophilic risk factors for symptomatic peripheral arterial disease*. *Journal of Vascular Surgery*, 41(2), 255–260. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2004.11.015>
- SPSS Inc, I. (2013). *SPSS Statistics Standard Edition*. Chicago, Illinois, EEUU.
- Stegmann, K., Ziegler, A., Ngo, E. T. K. M., Kohlschmidt, N., Ermert, A., & Koch, M. C. (1999). *Linkage Disequilibrium of MTHFR Genotypes*. 29(February), 23–29. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/1018-4813/02>
- Sverre.C., C., Suzanne.C., C., Ted., K., Jan.P., V., & Frits.R., R. (2005). *Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events*. *Journal of the American Medical Association*, 293(19), 2352–2361. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1001/jama.293.19.2352> LK - <http://resolver.ebscohost.com/openurl?sid=EMBASE&issn=00987484&id=doi:10.1001%2Fjama.293.19.2352&atitle=Thrombophilia%2C+clinical+factors%2C+and+recurrent+venous+thrombotic+events&stitle=J.+Am.+Med.+Assoc.&title=Journal+of+the+American+Medical+Association&volume=293&issue=19&spage=2352&epage=2361&aulast=Christiansen&aufirst=Sverre+C.&auinit=S.C.&aufull=Christiansen+S.C.&coden=JAMAA&isbn=&pages=2352-2361&date=2005&auinit1=S&auinitm=C>
- Thermo Scientific*. (2016). *NanoDrop One* - Guía de usuario. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: NanoDrop One website: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/3091-NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-SPANISH.pdf>
- TIB MOLBIOL. (2016). *Factor V (Leiden) Detection of the G1691A DNA variation in the Factor V gene*.
- Tormene, D., Simioni, P., Prandoni, P., Franz, F., Zerbinati, P., Tognin, G., & Girolami, A. (2002). *The incidence of venous thromboembolism in thrombophilic children: A prospective cohort study*. *Blood*, 100(7), 2403–2405. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1186>

- Torres, J. D., Cardona, H., Álvarez, L., Cardona-Maya, W., Castañeda, S. A., Quintero-Rivera, F., Tobón, L. (2006). *Inherited thrombophilia is associated with deep vein thrombosis in a Colombian population. American Journal of Hematology*, 81(12), 933–937. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1002/ajh.20733>
- Turpie, A. G. G., & Esmon, C. (2011). *Venous and arterial thrombosis - Pathogenesis and the rationale for anticoagulation. Thrombosis and Haemostasis*, 105(4), 586–596. <https://doi.org/10.1160/TH10-10-0683>
- Ueland, P. M., Hustad, S., Schneede, J., Refsum, H., & Vollset, S. E. (2001). *Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. Trends in Pharmacological Sciences*, 22(4), 195–201. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01675-8](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01675-8)
- Valtueña, P., M, J., Ara, Y., & R, J. (2007). La clínica y el laboratorio. In *Balcells. La clínica y el laboratorio* (22nd ed., Vol. 13, pp. 11–33). <https://doi.org/10.1016/B978-84-458-2585-3/00029-4>
- Van Der Put, N. M. J., Gabreëls, F., Stevens, E. M. B., Smeitink, J. A. M., Trijbels, F. J. M., Eskes, T. K. A. B., Blom, H. J. (1998). *A Second Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects? The American Journal of Human Genetics*, 62(5), 1044–1051. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1086/301825>
- Varga, E. A., & Moll, S. (2004). *Prothrombin 20210 Mutation (Factor II Mutation). Circulation*, 110(3), e15–e18. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000135582.53444.87>
- Villanueva Cañadas, E. (2019). Principales técnicas de investigación genética de los indicios. In *Medicina legal y toxicología* (Seventh Ed, pp. 1365–1370). Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/B978-84-9113-096-3/00091-4>
- Voorberg, J., Roelse, J., Mertens, K., van Mourik, J. A., Koopman, R., Büller, H., ten Cate, J. W. (1994). *Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506of factor V. The Lancet*, 343(8912), 1535–1536. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de:

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92939-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92939-4)

- Vulliamy, T., Kaeda, J., & Bain, B. J. (2008). Análisis molecular y citogenético. In *Dacie y Lewis. Hematología Práctica* (12th Editi, pp. 477–509). Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1016/B978-84-8086-229-5.50021-7>
- Wahed, A., & Dasgupta, A. (2015). Chapter 16 - *Thrombophilias and Their Detection*. In *Hematology and Coagulation* (pp. 263–275). Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800241-4.00016-4>
- Watson, J. ., & Crick, F. H. . . (1953). *MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS*.
- While, R. (2003). The Epidemiology of Venous Thromboembolic Disease Venous Thromboembolism. *Circulation*, *107*(90231), 4–9. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000078468.11849.66>
- White, R. H., & Keenan, C. R. (2009). *Effects of race and ethnicity on the incidence of venous thromboembolism*. *Thrombosis Research*, *123*(SUPPL. 4), S11–S17. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(09\)70136-7](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(09)70136-7)
- Wilbert, S., & McClung, J. A. (2016). *Biostatistics Used for Clinical Investigation of Coronary Artery Disease*.
- Yang, B., Liu, Y., Li, Y., Fan, S., Zhi, X., Lu, X., Sun, G. (2013). *Geographical Distribution of MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G Gene Polymorphisms in China: Findings from 15357 Adults of Han Nationality*. *PLoS ONE*, *8*(3), e57917. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057917>
- Zetterberg, H., Regland, B., Palmér, M., Ricksten, A., Palmqvist, L., Rymo, L., Blennow, K. (2002). Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *European Journal of Human Genetics*, *10*(2), 113–118. Recuperado el 10 de mayo de 2019 de: <https://doi.org/10.1038/sj/ejhg/5200767>
- Zivelin, A., Griffin, J. H., Xu, X., Pabinger, I., Samama, M., Conard, J., ...

Seligsohn, U. (2016). *A Single Genetic Origin for a Common Caucasian Risk Factor.*

ANEXOS

Anexo 1. Permiso del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito

2018-102T



Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos Universidad San Francisco de Quito

El Comité de Revisión Institucional de la USFQ
The Institutional Review Board of the USFQ

Aprobación MSP, Oficio No. MSP-VGV5-2016-0244-O, 26 de Abril de 2016

Quito, 14 de noviembre de 2018

Señorita
Paola Alexandra Yáñez Castillo
Investigadora Principal
Servicio de Genética Médica del HE-1
Ciudad

De mi mejor consideración:

Por medio de la presente, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito se complace en informarle que su solicitud de revisión y aprobación del estudio de investigación "Evaluación de la frecuencia de los polimorfismos de Factor V, Factor II, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, y PAI-1 en una población mestizo-ecuatoriana del Distrito Metropolitano de Quito" ha sido aprobada el día de hoy como un estudio *expedito*, debido a que la investigación va a tomar datos personales pero el investigador asegura que serán codificados para el análisis y presentación de los resultados y una vez concluido el estudio cualquier dato que pudiese identificar al participante será borrado.

El CEISH - USFQ aprueba el estudio ya que cumple con los siguientes parámetros:

- El proyecto de investigación muestra metas y/o objetivos de significancia científica con una justificación y referencias.
- El protocolo de investigación cuenta con los procedimientos para minimizar sus riesgos de sus participantes y/o los riesgos son razonables en relación a los beneficios anticipados del estudio.
- Los participantes del estudio tienen el derecho a retirarse del estudio y su participación su conseguida a través de un proceso de consentimiento informado
- El protocolo cuenta con provisiones para proteger la privacidad y confidencialidad de los participantes del estudio en sus procesos de recolección, manejo y almacenamiento de datos
- El protocolo detalla las responsabilidades del investigador

Además el investigador principal de este estudio ha dado contestación a todas las dudas y realizado todas las modificaciones que este Comité ha solicitado en varias revisiones. Los documentos que se aprueban y que sustentan este estudio es la versión # 2 de noviembre 08, 2018 que incluyen:

- Solicitud de revisión y aprobación de estudio de investigación, 11 páginas;
- Solicitud de aplicación al consentimiento informado por escrito, 5 páginas;
- Formulario de Recolección de muestras, 1 páginas;
- Hoja de vida de la investigadora principal, 2 páginas.

Casilla Postal 17-12-841, Quito, Ecuador
comitebioetica@usfq.edu.ec
PBX (593-2) 297-1700 ext 1149

2018-102T

Esta aprobación tiene una duración de **un año (365 días)** transcurrido el cual se deberá solicitar una extensión si fuere necesario. En toda correspondencia con el Comité de Bioética favor referirse al siguiente código de aprobación: **2018-102T**. El Comité estará dispuesto a lo largo de la implementación del estudio a responder cualquier inquietud que pudiese surgir tanto de los participantes como de los investigadores.

Favor tomar nota de los siguientes puntos relacionados con las responsabilidades del investigador para este Comité:

1. El Comité no se responsabiliza por los efectos de eventos adversos que pudieran ser consecuencia de su estudio, los cuales son de entera responsabilidad del investigador principal. Sin embargo, es requisito informar a este Comité sobre cualquier novedad, especialmente eventos adversos, dentro de las siguientes 24 horas, explicando las medidas se tomaron para enfrentar y/o manejar el mencionado evento adverso.
2. El Comité no se responsabiliza por los datos que hayan sido recolectados antes de la fecha de esta carta; los datos recolectados antes de la fecha de esta carta no podrán ser publicados o incluidos en los resultados.
3. El Comité ha otorgado la presente aprobación en base a la información entregada por los solicitantes, quienes al presentarla asumen la veracidad, corrección y autoría de los documentos entregados.
4. De igual forma, los solicitantes de la aprobación son los responsables por la ejecución correcta y ética de la investigación, respetando los documentos y condiciones aprobadas por el Comité, así como la legislación vigente aplicable y los estándares nacionales e internacionales en la materia.
5. Su investigación es observacional con la recolección de muestras biológicas. Por lo tanto, es su obligación solicitar la aprobación de su estudio de la Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud del Ministerio de Salud Pública. Información: <https://www.salud.gob.ec/autorizacion-de-investigaciones-en-salud/>

Deseándole los mejores éxitos en su investigación, se solicita a los investigadores que notifiquen al Comité la fecha de terminación del estudio.

Atentamente,



Iván Sisa, MD, MPH, MS
Presidente Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos USFQ
cc. Archivo general, Archivo protocolo



Casilla Postal 17-12-841, Quito, Ecuador
comitebioetica@usfq.edu.ec
PBX (593-2) 297-1700 ext 1149

Anexo 2. Concentración e índices de absorbancia: 260/280 nm y 260/230 nm promedio de todas las muestras

CÓDIGO	CONCENTRACIÓN	UNIDADES	PROMEDIO 260/280	PROMEDIO 260/230
PTM01	62	ng/μL	1,72	1,21
PTM02	46	ng/μL	1,72	1,11
PTM03	57	ng/μL	1,75	1,24
PTM04	77	ng/μL	1,73	1,32
PTM05	60	ng/μL	1,79	1,13
PTM06	49	ng/μL	1,67	1,67
PTM07	50	ng/μL	1,67	1,12
PTM08	95	ng/μL	1,7	1,14
PTM09	56	ng/μL	1,66	1,13
PTM10	68	ng/μL	1,78	1,64
PTM11	69	ng/μL	1,71	1,28
PTM12	57	ng/μL	1,72	1,29
PTM13	50	ng/μL	1,71	1,71
PTM14	50	ng/μL	1,67	0,96
PTM15	54	ng/μL	1,69	1
PTM16	32	ng/μL	1,73	1,13
PTM17	37	ng/μL	1,69	0,92
PTM18	36	ng/μL	1,7	1,01
PTM19	23	ng/μL	1,72	1,04
PTM20	42	ng/μL	1,73	1
PTM21	85	ng/μL	1,78	1,36
PTM22	51	ng/μL	1,73	1,36
PTM23	58	ng/μL	1,73	1,17
PTM24	28	ng/μL	1,67	1,13
PTM25	49	ng/μL	1,74	1,08
PTM26	60	ng/μL	1,67	1,1
PTM27	31	ng/μL	1,67	1,04
PTM28	44	ng/μL	1,66	0,96
PTH01	63	ng/μL	1,94	1,68
PTH02	43	ng/μL	1,99	2,08
PTH03	57	ng/μL	1,89	1,58
PTH04	55	ng/μL	1,81	1,38
PTH05	45	ng/μL	1,74	1,29
PTH06	68	ng/μL	1,76	1,35
PTH07	46	ng/μL	1,93	1,62
PTH08	24	ng/μL	1,72	1,3
PTH09	68	ng/μL	1,8	1,8

PTH10	78	ng/μL	1,85	1,62
PTH11	43	ng/μL	1,86	1,77
PTH12	45	ng/μL	1,83	1,62
PTH13	36	ng/μL	1,76	1,33
PTH14	81	ng/μL	1,8	1,7
PTH15	47	ng/μL	1,85	1,72
PTH16	30	ng/μL	1,79	1,64
PTH17	52	ng/μL	1,73	1,35
PTH18	66	ng/μL	1,7	1,25
PTH19	78	ng/μL	1,7	1,26
PTH20	76	ng/μL	1,74	1,36
PTH21	68	ng/μL	1,71	1,23
PTH22	57	ng/μL	1,75	1,41
PTH23	53	ng/μL	1,76	1,53
PTH24	46	ng/μL	1,75	1,48
PTH25	80	ng/μL	1,79	1,62
PTH26	71	ng/μL	1,74	1,38
PTH27	49	ng/μL	1,75	1,43
PTH28	33	ng/μL	1,83	1,23
PTM29	63	ng/μL	1,71	1,23
PTM30	31	ng/μL	1,92	1,69
PTM31	20	ng/μL	1,93	1,5
PTM32	31	ng/μL	1,87	1,59
PTM33	53	ng/μL	1,73	1,24
PTM34	47	ng/μL	1,79	1,5
PTM35	40	ng/μL	1,74	1,33
PTM36	56	ng/μL	1,76	1,61
PTM37	49	ng/μL	1,8	1,62
PTM38	50	ng/μL	1,79	1,56
PTM39	54	ng/μL	1,76	1,63
PTM40	33	ng/μL	1,73	1,07
PTM41	54	ng/μL	1,93	1,3
PTM42	29	ng/μL	1,9	1,59
PTM43	62	ng/μL	1,80	1,66
PTM44	180	ng/μL	1,80	2,17
PTM45	46	ng/μL	1,90	1,78
PTM46	43	ng/μL	1,80	1,57
PTM47	41	ng/μL	1,70	1,3
PTM48	30	ng/μL	1,80	1,71
PTM49	25	ng/μL	1,90	1,75
PTM50	58	ng/μL	1,80	1,59

PTM51	49	ng/μL	1,80	1,58
PTM52	46	ng/μL	1,80	1,77
PTM53	103	ng/μL	1,90	1,96
PTM54	25	ng/μL	1,80	1,78
PTM55	33	ng/μL	1,80	1,71
PTM56	56	ng/μL	1,80	1,91
PTH29	31	ng/μL	1,80	6,22
PTH30	20	ng/μL	1,70	1,95
PTH31	50	ng/μL	1,70	15,16
PTH32	50	ng/μL	1,80	4,14
PTH33	31	ng/μL	1,80	3,08
PTH34	45	ng/μL	1,80	2
PTH35	58	ng/μL	1,70	2,77
PTH36	63	ng/μL	1,80	4,74
PTH37	28	ng/μL	1,90	2,84
PTH38	31	ng/μL	1,80	2,88
PTH39	33	ng/μL	1,80	2,4
PTH40	60	ng/μL	1,80	3,37
PTH41	35	ng/μL	1,20	1,93
PTH42	87	ng/μL	1,90	1,59
PTH43	96	ng/μL	1,72	1,28
PTH44	94	ng/μL	1,71	1,35
PTH45	87	ng/μL	1,68	1,09
PTH46	90	ng/μL	1,66	1,23
PTH47	265	ng/μL	1,74	1,61
PTH48	44	ng/μL	1,80	1,71
PTH49	48	ng/μL	1,70	1,42
PTH50	40	ng/μL	1,80	1,82
PTH51	42	ng/μL	1,80	1,82
PTH52	53	ng/μL	1,70	1,55
PTH53	31	ng/μL	1,70	1,41
PTH54	45	ng/μL	1,70	1,46
PTH55	58	ng/μL	1,70	1,55
PTH56	61	ng/μL	1,70	1,42
PTM57	71	ng/μL	1,90	1,4
PTM58	253	ng/μL	1,70	2,2
PTM59	59	ng/μL	1,70	1,3
PTM60	58	ng/μL	1,60	1,3
PTM61	36	ng/μL	1,70	1,2
PTM62	48	ng/μL	1,70	1,13
PTM63	75	ng/μL	1,72	1,43

PTM64	50	ng/μL	1,65	1,2
PTM65	50	ng/μL	2,83	1,2
PTM66	69	ng/μL	1,64	1,33
PTM67	22	ng/μL	1,72	1,73
PTM68	96	ng/μL	1,73	1,59
PTM69	68	ng/μL	1,67	1,47
PTM70	63	ng/μL	1,64	1,24
PTM71	38	ng/μL	1,7	1,1
PTM72	55	ng/μL	1,63	1,24
PTM73	64	ng/μL	1,64	1,25
PTM74	60	ng/μL	1,65	1,37
PTM75	53	ng/μL	1,70	1,33
PTM76	97	ng/μL	1,68	1,48
PTM77	44	ng/μL	1,66	1,22
PTM78	61	ng/μL	1,69	1,16
PTM79	64	ng/μL	1,70	1,3
PTM80	21	ng/μL	1,92	1,74
PTM81	88	ng/μL	1,83	2
PTM82	42	ng/μL	1,83	1,59
PTM83	65	ng/μL	1,70	1,3
PTM84	73	ng/μL	1,74	1,45
PTH57	90	ng/μL	1,82	1,66
PTH58	46	ng/μL	1,71	1,4
PTH59	38	ng/μL	1,73	1,46
PTH60	25	ng/μL	1,68	1,71
PTH61	55	ng/μL	1,70	1,42
PTH62	51	ng/μL	1,78	1,85
PTH63	57	ng/μL	1,75	1,7
PTH64	77	ng/μL	1,75	1,58
PTH65	49	ng/μL	1,73	1,53
PTH66	48	ng/μL	1,73	1,48
PTH67	50	ng/μL	1,89	1,8
PTH68	44	ng/μL	1,72	1,48
PTH69	58	ng/μL	1,70	1,41
PTH70	51	ng/μL	1,75	1,51
PTH71	29	ng/μL	2,28	1,51
PTH72	40	ng/μL	1,73	1,55
PTH73	71	ng/μL	1,70	1,25
PTH74	59	ng/μL	1,64	1,16
PTH75	48	ng/μL	1,81	2,04
PTH76	48	ng/μL	1,69	1,35

PTH77	112	ng/μL	1,78	1,83
PTH78	16	ng/μL	1,99	7,37
PTH79	25	ng/μL	1,73	1,71
PTH80	42	ng/μL	1,68	1,41
PTH81	39	ng/μL	1,71	1,62
PTH82	70	ng/μL	1,7	1,5
PTH83	80	ng/μL	1,77	1,55
PTH84	50	ng/μL	1,87	1,9
Promedio	56	ng/μL	1,8	1,7
Valor máximo	265		2,83	15,16
Valor mínimo	16		1,2	0,92

