

Análisis de mutaciones en los factores II y V de la coagulación y en la metiltetrahidrofolato reductasa en pacientes con trombofilia atendidos en Dinámica IPS en Medellín entre 2017-2018

Jaramillo Jaramillo Carolina¹, González Niño Andrés², Acevedo Toro Paola Andrea³.

¹Bacterióloga, Especialista en Hematología, Laboratorio Biología molecular Dinámica, estudiante Maestría en Microbiología y Bioanálisis. Grupo Hematopatología Molecular. Universidad de Antioquia. ²Bacteriólogo, Especialista en Bioinformática clínica, M.Sc en Biología Molecular y Biotecnología Coordinador Unidad de Genética, Dinámica. Laboratorio Biología Molecular Dinámica, docente Universidad de Antioquia. ³Microbióloga y Bioanalista, M.Sc en Ciencias Básicas Biomédicas, docente Escuela de Microbiología Universidad de Antioquia, Investigadora - Grupo Hematopatología Molecular.

Resumen

La trombofilia es la predisposición genética o adquirida para el desarrollo de un evento de hipercoagulabilidad, el cual puede desencadenar el desarrollo de trombosis, afectando los vasos sanguíneos tanto venas como arterias. La fisiopatología para la generación de estos cuadros trombóticos consiste en mecanismos que alteran de forma cualitativa y cuantitativa los factores de la coagulación. En este tipo de trastornos también se ha descrito la alteración de los anticoagulantes naturales, donde se generan inhibiciones o resistencia de estos, promoviendo así, la producción de trombos en la luz vascular.

Las pruebas moleculares empleadas para la detección de las mutaciones en los factores de la coagulación son un punto clave para el diagnóstico de las trombofilias heredadas, también tiene gran importancia en el pronóstico de los pacientes que desarrollan la enfermedad, debido a la severidad clínica que confiere la existencia de dichas mutaciones. Esta investigación incluye el análisis de mutaciones en los factores II y V de la coagulación y en la enzima Metilentráhidrofolato reductasa (MTHFR) por PCR en tiempo real en pacientes menores de 50 años que han generado hipercoagulabilidad, evaluando genóticamente la presencia de dichas variaciones. La mutación C677T se detectó en individuos con trombosis arterial y venoso, esto se correlaciona con lo reportado en estudios anteriores, y demuestra la relación entre el defecto en la enzima MTHFR con el daño endotelial independiente de los niveles de homocisteína en suero. La mutación H1299R se detectó en 16 (22.2%) individuos, siendo éste el primer estudio en Colombia

que reporta dicha variante, la cual se asocia a resistencia de la proteína C activada de forma leve generando predisposición a generar eventos de hipercoagulabilidad.

Keywords: hipercoagulabilidad; trombofilia; mutaciones; PCR en tiempo real.

Summary

Thrombophilia is the genetic predisposition or acquired for the development of an event of hypercoagulability, which can trigger the development of thrombosis, affecting blood vessels both veins and arteries. The pathophysiology for the generation of these thrombotic conditions consists of mechanisms that alter the coagulation factors qualitatively and quantitatively. In this type of disorders the alteration of natural anticoagulants has also been described, where inhibitions or resistance of these are generated, thus promoting the production of thrombi in the vascular lumen.

The molecular tests used for the detection of mutations in the coagulation factors are a key point for the diagnosis of inherited thrombophilias, it also has great importance in the prognosis of patients who develop the disease, due to the clinical severity that confers the existence of such mutations. This investigation includes the analysis of mutations in factors II and V of coagulation and in the enzyme Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) by real-time PCR in patients younger than 50 years that have generated hypercoagulability, evaluating genotypically the presence of such variations. The C677T mutation was detected in individuals with arterial and venous thrombosis, this correlates with that reported in previous studies, and demonstrates the relationship between the defect in the MTHFR enzyme with endothelial damage independent of serum homocysteine levels. The H1299R mutation was detected in 16 (22.2%) individuals, this being the first study in Colombia reporting this variant, which is associated with a slightly activated resistance of protein C generating a predisposition to generate hypercoagulable events.

Keywords: hypercoagulability; thrombophilia; mutations; real time PCR.

Introducción:

La trombofilia se conoce como la predisposición genética o adquirida para formar trombos a nivel intravascular y desarrollar estados de hipercoagulabilidad los cuales pueden desencadenar en enfermedad tromboembólica, como trombosis venosa profunda (TVP), tromboembolismo pulmonar (TEP) (1,2) y trombosis a nivel cerebral donde es común el progreso hacia accidente cerebrovascular (ACV) (3). Los mecanismos fisiopatológicos que generan estas alteraciones a nivel hemostático se clasifican en dos, la primera, la sobreexpresión de los factores de la coagulación por alteraciones cualitativas o cuantitativas, y la segunda la inhibición o resistencia de los anticoagulantes naturales (4).

La probabilidad de desarrollar eventos trombóticos en pacientes que presentan trombofilia es superior si se compara con el resto de la población, no obstante, no todos los pacientes con predisposición genética y/o adquirida, llegan a desarrollar la enfermedad (5,6).

La trombosis venosa profunda tiene importancia a nivel mundial por su alta morbilidad, la incidencia al año 2013 a nivel mundial fue de 1 por cada 100 adultos mayores, 1 por cada 1000 adultos jóvenes y 1 por cada 100.000 niños (7,8). Un estudio realizado en nuestro país en 1996 por Dennis y colaboradores, reportó que el 7% de la población estudiada en condiciones de hospitalización, presentaban al menos un episodio de trombosis venosa profunda. De esta manera se ve afectado en gran medida el sistema de salud, debido al alto costo que genera el tratamiento y manejo de esta enfermedad, sumado a la mortalidad hospitalaria (9).

Entre las predisposiciones trombofílicas adquiridas más comunes se encuentran, los traumas físicos, posquirúrgicos de cirugía ortopédica, el uso de anticonceptivos orales, el embarazo (10,11) y el cáncer (12). Dentro de las condiciones genéticas asociadas a trombofilias se han descrito las mutaciones en los factores de la coagulación, siendo las más importantes por su ocurrencia, las variantes en los factores II y V de la coagulación y en los inhibidores naturales como la antitrombina, la proteína C y la proteína S. También se ha estudiado ampliamente el papel de los polimorfismos en la metilentratrahidrofolato reductasa (MTHFR), enzima importante en la remetilación de la homocisteína (13,14).

La protrombina o factor II de la coagulación es una proteína procoagulante dependiente de vitamina K que participa en la etapa final de la formación del coágulo, ésta se escinde

proteolíticamente para activarse y convertirse en trombina, la cual actúa sobre la molécula de fibrinógeno para la formación de la malla de fibrina y consecuentemente la formación de un coágulo estable. Además, participa en el proceso natural de anticoagulación por acción de la proteína C (15).

El gen que codifica para protrombina tiene un tamaño de 21 kb, localizado en el cromosoma 11 (11p11.2) y contiene 14 exones (15, 16). En 1996, Poort y colaboradores, identificaron un polimorfismo de nucleótido simple en la posición 20210 en la región UTR 3' del gen de la protrombina que consiste en un cambio de guanina por adenina después del sitio de poliadenilación, el cual se asocia con altos niveles de protrombina (16)

La alteración en la secuencia c.20210G>A es un defecto autosómico dominante que representa una mutación de ganancia de función con mayor reconocimiento del sitio de escisión y aumento del RNAm y consecuentemente incremento en la síntesis de la proteína (17).

Las consecuencias clínicas por la desregulación post-transcripcional del RNAm de la protrombina, se deben a los altos niveles de protrombina plasmática, por lo tanto, hay una hiperactivación de la trombina y generación de trombos. (10) Además, se ha reportado que los pacientes con la mutación G20210A presentan un engrosamiento mayor de la íntima media, factor que es predisponente para la oclusión trombótica (16).

La concentración de protrombina en pacientes con el polimorfismo G20210A es >1,15 U/ml (aumento de 25 % de la concentración habitual), lo que dobla el riesgo de (TVP) y lo incrementa en seis veces en personas con antecedente previo de la misma (15).

La mutación en el gen de la protrombina, es el segundo factor de riesgo hereditario para el desarrollo de enfermedad tromboembólica tanto a nivel venoso como arterial, después de la mutación del factor V de Leyden (18). La frecuencia en la población general para los heterocigotos de G20210A que no han desarrollado eventos tromboembólicos es del 2% al 5% y en los pacientes que expresan la enfermedad es del 6% al 18%. La homocigosidad es rara, por lo tanto, ha sido poco estudiada, pero según reportes de estudios de casos, incrementa el riesgo de sufrir trombosis por encima de lo observado en los heterocigotos (16). En 2006 Bosler y colaboradores reportaron 67 casos en todo el mundo, dos de los individuos estudiados pertenecían a la misma familia en Bulgaria (15).

El factor V de la coagulación, también conocido como proacelerina o factor lábil, es sintetizado en el hígado y circula libremente como una cadena polipeptídica simple en una forma procoagulante inactiva y su vida media plasmática es de 12 a 36 horas.

Su importancia en el sistema de la coagulación radica en que cumple funciones procoagulantes, para la activación de la trombina y anticoagulantes como cofactor de la proteína C en sinergia con la proteína S (19).

El factor V está constituido por 6 dominios (A1, A2, B, A3, C1 y C2). El dominio B se ubica entre los dominios A2 y A3, el cual está flanqueado por los sitios de escisión proteolíticos Arg709 y Arg1545 y dentro del mismo dominio se encuentra el sitio de escisión Arg1018. Las dos proteínas capaces de generar proteólisis del factor V interactuando con los sitios de escisión son la trombina y el factor Xa, esta interacción activa el factor V (FVa) en presencia de membrana plaquetaria que contiene fosfolípidos cargados negativamente, El FVa junto con el factor Xa forman un complejo en la superficie celular, el cual activará eficientemente la protrombina en trombina (20).

El gen del factor V está ubicado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q24.2) y contiene 25 exones. Se han descrito varias mutaciones en este gen, sin embargo, en 1994, Rogier Bertina de Leiden en Holanda comprobó que en el 95% de los casos de tromboembolia venosa con alteración en la proteína C, eran secundarios a una mutación en el gen codificante para el Factor V de la coagulación, que ocasionaba resistencia del factor V a la proteólisis de la proteína C, este trastorno es conocido como factor V de Leiden (21). Otros polimorfismos en el factor V asociados a resistencia a la proteína C son factor V de Cambridge (22), factor V de Liverpool (23), Haplotipo HR2 (24), mutación R485K (25) y la variante Y1702C (26). A diferencia de estos, el factor V Hong Kong también descrito como variante genética, no está asociada a predisposición para el desarrollo de trombosis (27).

El factor V de Leiden, consiste en un cambio de guanina por adenina en el nucleótido 1691 (G1691A) que da lugar a un cambio de arginina por glutamina en el codón 506 (R506Q), sitio de escisión de la proteína C activada (13,28). Consecuentemente se presenta la

resistencia a la proteína C que consiste en aumento del factor Va plasmático y aumento en la generación de protrombina, hechos que llevan al desarrollo de estado de hipercoagulabilidad, presentando manifestaciones clínicas asociadas a tromboembolia venosa (29,30).

El factor V de Leiden es la primera causa de trombofilias heredadas, está presente en el 80% de los pacientes con resistencia a la proteína C activada y en el 20% de los casos que desarrollan tromboembolismo venoso (31). La prevalencia más alta de la mutación del factor V Leiden se presenta en Europa, predominantemente en Chipre, el Sur de Suecia y Alemania, también se presenta en Arabia Saudita y en Israel. No se ha descrito en grupos étnicos como los africanos, chinos y japoneses. En nuestro medio la prevalencia varía entre el 2% y 3% de los pacientes con resistencia a la proteína C (32).

La mutación H1299R fue reportada en 1996 (24), y consiste en la sustitución de una adenina por guanina en la posición 4070 en el exón 13 del gen del factor V, que genera un cambio de histidina por arginina en el codón 1299. Este polimorfismo, también es conocido como el Haplotipo R2, posteriormente se describió que hace parte de un conjunto de variantes del factor V, el grupo de estas alteraciones ha sido llamado HR2 (28). Se ha demostrado que esta mutación influye en la concentración de los niveles plasmáticos del factor V y que los portadores de ésta presentan resistencia a la proteína C activada de forma leve. Además, al estar presente en un individuo simultáneamente con la mutación R506Q, aumenta la patogenicidad y el riesgo de sufrir enfermedad tromboembólica, es por esta razón que se considera un factor de riesgo para los portadores del factor V de Leiden (33)

La coherencia de la mutación factor V de Leiden con variaciones genéticas asociadas a deficiencia cuantitativa del factor V resulta en un factor predisponente para estado procoagulante, condición conocida como Resistencia a la proteína C pseudo-homocigota. (25, 26).

Se han descrito varias mutaciones asociadas a la deficiencia cuantitativa del factor V. La más importante es la mutación A5279G, que consiste en la sustitución de adenina por una guanina que conlleva a un cambio de aminoácidos el cual consiste en la sustitución de

tirosina por cisteína, Y1702C (25). Es una mutación poco frecuente, pero en Italia se ha reportado como la causa más común de deficiencia del factor V en esa población (34).

Otro factor desencadenante de estados de hipercoagulabilidad son las alteraciones genéticas en la 5-10 metilentratetrahidrofolato (MTHFR), enzima importante en el metabolismo de la homocisteína, el cual es un aminoácido que se sintetiza como producto intermedio en el metabolismo de la metionina (35). La homocisteína sufre procesos para la regeneración de la metionina por medio de la MTHFR, que se encarga de sintetizar 5 metilentetrahidrofolato, donante del grupo metil y de esta manera se remetiliza la homocisteína (36, 37).

El gen que codifica para la MTHFR se localiza en el cromosoma 1 (1p36.22) y contiene 13 exones. Las variantes en este gen influyen en la susceptibilidad a la enfermedad vascular oclusiva, defectos del tubo neural, cáncer de colon, leucemia aguda, y se asocia con inflamación sistémica (38).

Se han descrito varias mutaciones en el gen de la MTHFR, siendo C677T la más importante por considerarse un factor de riesgo para la enfermedad vascular y aterosclerosis (39).

La mutación C677T en el gen de la MTHFR consiste en una sustitución de una citosina por una timina en el nucleótido 677 convirtiendo un residuo de alanina en valina, consecuentemente se presenta disminución de hasta un 50% en la actividad de la enzima (40), llevando a la acumulación en sangre de homocisteína y a disfunción endotelial por aumento del estrés oxidativo y generación de peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos y superóxidos (38).

La mutación A1298C genera el remplazo de una alanina por glutamina en la posición 429. Este polimorfismo también está asociado a reducción de la actividad enzimática de MTHFR que lleva a deficiencia en el proceso de remetilación y por lo tanto a la acumulación de la homocisteína a nivel plasmático (36,40). Sin embargo, la hiperhomocisteinemia asociada a las mutaciones en MTHFR es una aseveración que causa controversia, ya que, estudios realizados en 2007 por Nadir y colaboradores (41) justifican que a pesar de que las variantes en MTHFR son factores de riesgo para desarrollar eventos trombóticos, no necesariamente se correlaciona con niveles aumentados de homocisteína.

Otras investigaciones que dan cuenta de ello son los estudios realizados por Ortega (42) y por Khimani (43), donde evidencian que no encontraron asociación entre los niveles de homocisteína y las mutaciones en MTHFR en los pacientes evaluados.

En 1998, Camacho y colaboradores (44) realizaron un estudio para determinar la presencia del factor V de Leiden y de la mutación C677T de la MTHFR en 150 individuos al azar y encontraron que ninguno era portador de la mutación del factor V de Leiden, pero el 48.7% de los individuos estudiados presentaban la mutación de C677T de la MTHFR.

En 2006, Torres y colaboradores estudiaron a 100 pacientes con TVP y 114 individuos como controles, y evidenciaron que el factor V de Leiden se asoció con la enfermedad en el 10% de los pacientes y que un 0.9% de los controles eran portadores. La mutación C677T estaba en el 73% de los pacientes (24% homocigotos y 49% heterocigotos) y en el 68.4% de los controles (19.3% homocigotos y 49.1% heterocigotos) (45)

En nuestro medio no se ha reportado la distribución genotípica y las frecuencias de las mutaciones H1299R y Y1702C del Factor V en individuos que padecen eventos tromboembólicos, el enfoque diagnóstico de estos pacientes incluye el estudio del Factor V de Leiden, la mutación en el Factor II G20210A y las mutaciones en la enzima MTHFR. A pesar de ello, estudios han demostrado la importancia de incluir la detección de las demás variantes del factor V, ya que pueden estar presentes concomitantemente con otros polimorfismos, inclusive podrían comportarse como factores de riesgo para la expresión fenotípica y pueden estar implicados en la severidad de la enfermedad (46, 47, 48).

El presente estudio incluyó el análisis de la mutación G20210A del factor II, las mutaciones R506Q (factor V de Leiden), H1299R, Y1702C del factor V, y las mutaciones C677T y A1298C en la enzima MTHFR para determinar cuál es la distribución genotípica en nuestra población y su asociación con la enfermedad tromboembólica.

Objetivo general

Analizar las mutaciones en los factores II y V de la coagulación y en la enzima metilentratrahidrofolato reductasa en pacientes con trombofilias atendidos en Dinámica IPS en Medellín entre 2017 – 2018

Objetivos específicos

1. Describir la población de estudio de acuerdo a sus características sociodemográficas básicas, hallazgos clínicos y de laboratorio.
2. Identificar las mutaciones en los factores II y V de la coagulación y en la enzima MTHFR en pacientes con trombofilia por la técnica PCR en tiempo real.
3. Determinar las frecuencias de las mutaciones en los factores II y V de la coagulación y en la enzima MTHFR en la población de Medellín.
4. Correlacionar las mutaciones presentes de los factores II y V de la coagulación y en la enzima MTHFR con los hallazgos clínicos de cada individuo estudiado.

Metodología

Tipo de estudio:

Es un estudio observacional descriptivo transversal.

Población de estudio:

La población de estudio del presente trabajo son pacientes que presentaron uno o más eventos tromboembólicos antes de los 50 años de edad atendidos en Dinámica IPS Medellín durante 2017-2018.

A esta población se le aplicaron los siguientes criterios de exclusión: Mujeres en estado de gestación, mujeres con uno o más abortos recurrentes espontáneos, pacientes con cirugías ortopédicas o invasivas en el último semestre, pacientes que presentaron en el último semestre infecciones bacterianas severas.

Diseño muestral:

El tamaño ideal de la muestra se calculó con el programa Epidat y arrojó un cálculo de 76 individuos con una confianza del 95%. El tipo de muestreo es no probabilístico. Se seleccionaron 72 individuos por conveniencia.

Recolección de la muestra:

Los pacientes luego de aceptar su participación y firmar el consentimiento informado y la encuesta, se sometieron a la toma de la muestra de sangre en un tubo con anticoagulante EDTA. Luego de la recolección de la muestra ésta fue almacenada a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

Diseño experimental:

Extracción de ADN

Se realizó extracción ADN genómico utilizando el juego de reactivos de Extracción automatizado *mSample Preparation System DNA Abbott-Promega®*, con una especificidad del 100% y una sensibilidad de 10 ng/reacción de ADN. Este tipo de extracción se basa en la captura de los ácidos nucleicos usando micropartículas magnéticas. Además, utiliza tiocianato de guanidina para la lisis celular e inhibición de DNAasas, adicionalmente incluye detergentes para eliminación de proteínas que pudieran degradar el ADN y alcohol etílico para la precipitación del mismo.

El proceso de extracción automatizado para diagnóstico *in vitro* (IVD) que ha sido estandarizado y validado previamente en el área de biología molecular del Laboratorio Clínico Dinámica Medellín. Para tal procedimiento se utilizó el instrumento para extracción automatizada de ADN *m2000sp Abbott Molecular* (49).

Cuantificación de ADN genómico:

Para la cuantificación del material de ADN obtenido en la extracción automatizada se utilizó el espectrofotómetro NanoDropTM 2000 de Thermo Scientific (50).

La concentración de ADN genómico recomendada para el ensayo de amplificación es de 5-200 ng/ μL , y la concentración obtenida en los eluidos usados en el estudio osciló entre 11.2 y 98.3 ng/uL.

Amplificación de ADN por el juego de reactivos Anyplex II Thrombosis SNP Panel Assay®

El procedimiento de la PCR en tiempo real se realizó de forma manual, El juego de reactivos ha sido suministrado por la casa comercial Annar Diagnóstica Import, distribuidor oficial de la marca Seegene en Colombia y el protocolo para amplificación con el juego de

reactivos con certificado IVD y CE Anyplex II Thrombosis SNP Panel Assay ha sido estandarizado previamente en el área de biología molecular del laboratorio clínico Dinámica. Anyplex II Thrombosis SNP Panel Assay® detecta seis SNP en una sola corrida de amplificación por PCR en tiempo real (R506Q, H1299R y Y1702C en el factor V, G20210A en el factor II y C677T y A1298C en la enzima MTHFR), para ello utiliza la tecnología patentada mTOCE, la cual permite identificar los múltiples polimorfismos mediante la temperatura de fusión del Catcher (Catcher-Tm). El Catcher contiene una señal fluorescente encargada de generar una señal para cada secuencia. El Tm tiene un valor diferente para los SNP que depende de la secuencia de nucleótidos de cada uno. Por lo tanto, esta tecnología contiene un valor de Catcher-Tm específico de cada secuencia objetivo, tabla 1.

El juego de reactivos está compuesto por 4 viales, uno que contiene el *primer* el cual es una mezcla de Oligos de TOCE, un segundo vial con la Pre-mix constituida por la polimerasa de DNA, el Uracil-ADN glicosilasa y un tampón que contiene los dNTPs, el tercer vial está compuesto por Agua libre de RNAsas utilizada para la preparación de la mezcla maestra y como control negativo, por último, el cuarto vial, constituye el control positivo el cual incluye 6 alelos de tipo salvaje (R506R, H1299H, Y1702Y, G20210G, C677C, A1298A) y 6 alelos mutantes (R506Q, H1299R, Y1702C, G20210A, C677T, A1298C).

Los componentes se almacenaron a -20°C y se descongeló en 4 oportunidades para la preparación de la mezcla maestra y uso en los experimentos.

Se utilizó el termociclador en tiempo real CFX96 Bio-Rad para la amplificación, el cual tiene la característica de detectar 4 señales fluorescentes simultáneamente utilizando los fluorocromos FAM, HEX, CALRED610, QUASAR670, siendo este el instrumento adecuado para la localización de los 6 SNP en una misma corrida. Previamente se programó con los ciclos y temperaturas recomendadas por la casa comercial para esta técnica de PCR en tiempo real múltiple.

La sensibilidad del juego de reactivos AnyplexII Thrombosis SNP Panel Assay® es de 300 copias/reacción (límite inferior de detección), es decir aproximadamente 1 ng/reacción de

ADN genómico humano). La especificidad del juego de reactivos es de 100%, ya que no muestra reactividad cruzada con otras especies cuando se ha evaluado la amplificación del target específico para cada una de las mutaciones (51, 52).

Tabla 1. Características de amplificación del control positivos para las mutaciones C677T, A198C, H1299R, R506Q, G20210A y sus genes silvestres.

	FAM			HEX			CAL RED610			QUASAR670		
<i>Secuencia de nucleótidos</i>	H1299R	C677T	R506Q	H1299H	C677C	R506R	Y1702C	A1298C	G20210A	Y1702Y	A1298A	G20210G
<i>Ciclo</i>	43	41	39	43	41	39	43	41	39	43	41	39
<i>RFU</i>	3647.849	3460.360	3238.880	1649.941	1562.527	1453.572	4218.317	4061.684	3851.260	2851.348	2680.788	2476.114
<i>Temperatura</i>	64	70	78	62	69	77	64	70	76	64	69	78
<i>d(RFU)dT</i>	379.291	457.624	430.805	119.889	147.565	171.656	383.683	464.749	326.193	318.442	384.176	282.049

RFU: unidad de fluorescencia relativa, **dRFU/dT:** cambio de nivel de fluorescencia.

Recolección de datos:

Para este estudio se diseñó una encuesta, la cual da cuenta de características sociodemográficas, antecedentes personales como el diagnóstico, datos clínicos, exámenes de laboratorio e imagenología que confirmen que ha sufrido algún hallazgo hipercoagulable, y tratamientos para trastornos asociados al sistema de la coagulación; y antecedentes familiares que incluían datos asociados a trombosis venosa profunda, tromboembolismo, ACV, abortos recurrentes, complicaciones en el parto, coagulación intravascular diseminada, que se presentaron en la familia (anexo 1)

Se diseñó una base de datos que incluía información como el resultado genotípico de las mutaciones asociados a trombofilia obtenido en el experimento de PCR en tiempo real, la edad del paciente y la edad de presentación del evento trombótico, la manifestación clínica donde se agruparon los tipos de trombosis según su presentación anatómica, estos grupos fueron definidos de la siguiente manera: 1. Trombosis venosa profunda (TVP), 2. Trombosis cerebral y/o Accidente cerebrovascular (ACV), 3. Tromboembolismo pulmonar (TEP), 4. Trombosis arterial, 5. Trombosis en estudio, 6. Trombosis de vena porta, 7. Trombosis arterial y venosa (diferentes eventos trombóticos que incluían afección arterial y venoso). También se incluyeron datos como antecedentes familiares y resultados de paraclínicos que el paciente informaba en el momento de llenar la encuesta, entre estos se

incluyeron: niveles de proteína C, resistencia a proteína C, niveles de proteína S, niveles de antígeno libre de proteína S, homocisteína, antitrombina y agregometría plaquetaria.

Análisis de datos:

Luego de realizar la extracción automatizada y finalizar la PCR en tiempo real, las curvas de amplificación se analizaron y los resultados se exportaron al software *Seegene Viewer* V2.0, también patentado por la casa comercial Seegene. Este sistema se encarga de analizar de forma rápida los resultados de cada paciente y entrega un reporte con interfaz gráfica donde analiza e interpreta que mutaciones se detectan y su expresión genotípica (homocigota o heterocigota).

Análisis estadístico:

La información fue descargada y analizada en el programa estadístico en SPSS versión 25.0. Para la descripción de las características sociodemográficas de los pacientes del estudio se utilizó el cálculo de frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas y para las variables cuantitativas se usaron medidas de resumen (posición, dispersión y tendencia central). Para determinar la frecuencia de las 6 mutaciones estudiadas, se calcularon frecuencias absolutas y relativas. Para comparar las mutaciones presentes de los factores II y V de la coagulación y en la enzima MTHFR (variables cualitativas) con los hallazgos clínicos de cada individuo estudiado se hizo igualmente a través de frecuencias absolutas y relativas.

Consideraciones Bioéticas:

Este estudio fue sometido al comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia quienes aprobaron la realización de esta investigación.

Se diseñó un consentimiento informado escrito que fue leído y explicado por personal de la investigación a los individuos que cumplieran con los requisitos necesarios para hacer parte del proyecto. Dentro de la intervención con el paciente se le explicó en qué consistía el estudio y cuál era la importancia de su participación, los beneficios y riesgos individuales, la confidencialidad de la información y la voluntariedad de su participación.

Se respetaron las recomendaciones para investigación biomédica de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial de 1964 y las normas científico técnicas y administrativas para la investigación en salud, Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, relacionado con los aspectos éticos de la investigación en humanos. Con base en el artículo 11 de dicha resolución, se determinó que este estudio es una investigación de mínimo riesgo (anexo 2)

Resultados:

Se incluyeron 72 pacientes con un promedio de edad $41,7 \pm 12,3$ años, con un mínimo de 15 años y un máximo de 94, la mayoría de los individuos estudiados fueron mujeres (76,4%). La edad de manifestación de los síntomas fue de $37,6 \pm 9,4$ años con un mínimo de 8 y máximo de 50 años, la patología predominante fue la trombosis venosa profunda (36,1%), seguida del accidente cerebrovascular (23,6%). De los pacientes estudiados, más del 50% conocían antecedentes en su familia de eventos trombóticos con presentación inexplicada, sin asociación a infecciones, cáncer o cirugías ortopédicas (tabla 2)

Tabla 2. Descripción de las características de la población

	n	%
Sexo		
Masculino	17	23,6
Femenino	55	76,4
Patología		
TVP	26	36,1
ACV	17	23,6
TEP	12	16,7
Trombosis arterial	7	9,7
Trombosis en estudio	5	6,9
Trombosis de vena porta	3	4,2
Trombosis arterial y venosa	2	2,8
Antecedentes familiares		
Si	30	53,6
No	26	46,4

TVP: trombosis venosa profunda, **ACV;** accidente cerebrovascular, **TEP:** tromboembolismo pulmonar.

De los 72 individuos estudiados, el 90% presentan al menos una mutación, el 23.6% tienen 2 mutaciones y el 4% poseen 3 mutaciones (tabla 3). Solo 7 individuos, que representan el 5% de la población estudiada, tuvieron detección silvestre del gen, estos pacientes manifiestan el evento trombótico con diagnósticos como accidente cerebrovascular cerebeloso en un individuo diagnosticado por resonancia magnética, trombosis venosa profunda en miembros inferiores en 5 individuos, y una mujer que desde los 8 años de edad ha presentado eventos trombóticos asociados a insuficiencia mitral severa con corrección quirúrgica en la infancia de canal auriculoventricular, y con válvula mecánica mitral a los 20 años de edad (figura 1)

Tabla 3. Frecuencia de mutaciones en los genes estudiados

		n	%
<i>MTHFR</i>	C677C	23	31,9
	C677T	49	68,1
	A1298A	51	70,8
	A1298C	21	29,2
<i>Factor V</i>	H1299H	56	77,8
	H1299R	16	22,2
	R506R	70	97,2
	R506Q	2	2,8
<i>Presencia de mutación</i>	Si	65	90,3
	No	7	9,7
<i>Número de genes mutados</i>	Ninguno	7	9,7
	1	45	62,5
	2	17	23,6
	3	3	4,2

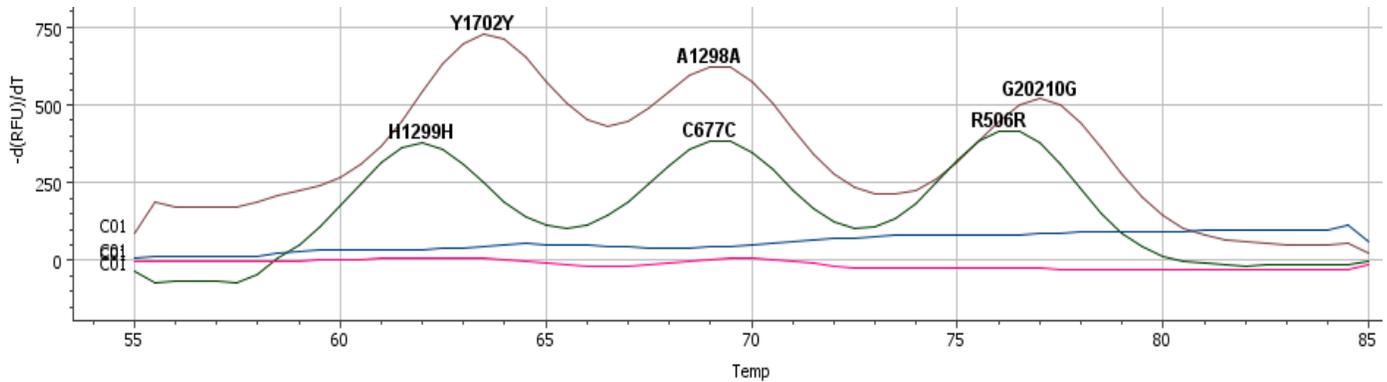


Figura 1. Curva de fusión de una paciente con insuficiencia mitral severa, con primer evento trombótico a los 8 años de edad. Presenta genes silvestres de MTHFR, factor V y II de la coagulación.

La mutación C677T de la enzima MTHFR fue la más frecuente, se encontró en el 68,1% de los individuos y el 19,4% se encontró de manera homocigota (figuras 2 y 3). Dicha mutación se detectó en las diferentes manifestaciones trombóticas incluidas en este estudio, con una presentación en el 100% de los pacientes con trombosis de vena porta (tabla 4).

Solo 21 (43%) individuos conocían antecedentes familiares asociados a eventos trombóticos como TVP, ACV y TEP, 21 (43%) declaraban ser los primeros en su familia en expresar la enfermedad, y 7 (14%) desconocían si en su familia se había presentado cualquier forma de manifestación trombótica.

Tabla 4. Distribución de las mutaciones en la enzima MTHFR asociadas con el evento trombótico

Patología	C677T				A1298C			
	C677C		C677T		A1298A		A1298C	
	n	%	n	%	n	%	n	%
TVP	8	30,8	18	69,2	19	73,1	7	26,9
ACV	8	47,1	9	52,9	13	76,5	4	23,5
TEP	3	25,0	9	75,0	8	66,7	4	33,3
Trombosis arterial	2	28,6	5	71,4	4	57,1	3	42,9
Trombosis en estudio	1	20,0	4	80,0	3	60,0	2	40,0
Trombosis de vena porta	0	0,0	3	100	3	100,0	0	0,0
Trombosis arterial y venosa	1	50,0	1	50,0	1	50,0	1	50,0

De los 49 individuos con dicha mutación, 23 tenían reportado en su historia clínica los niveles de homocisteína, solo uno presentaba hiperhomocisteinemia, el resto tenían niveles normales de este compuesto. 33 con reportes de curva de agregabilidad plaquetaria, de los cuales 11 presentaban hiperagregabilidad con ADP y epinefrina, 13 solo con epinefrina y 9 con reporte normal (tabla 5).

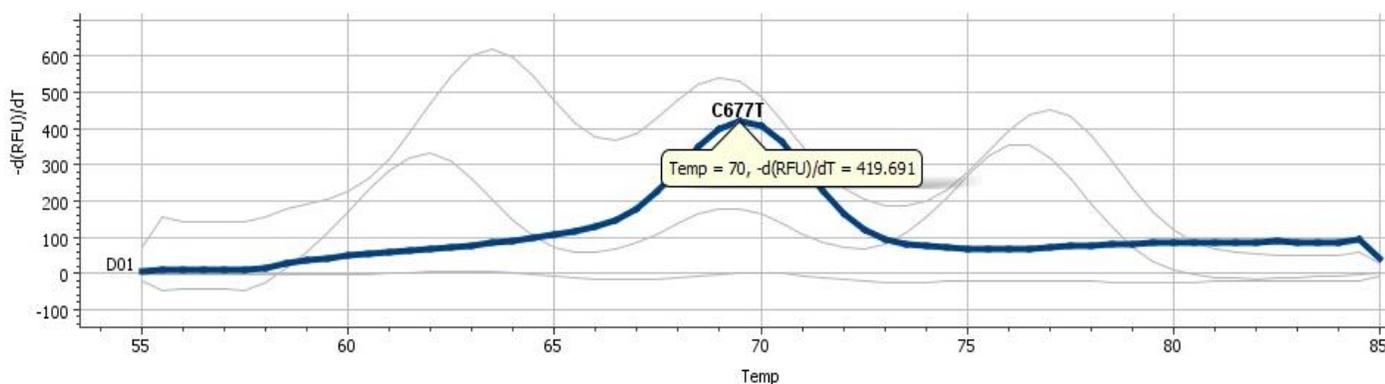


Figura 2. Curva de fusión que muestra la mutación C677T con **herencia heterocigota**, en un hombre de 26 años de edad con episodio de trombosis venosa profunda, sin antecedentes familiares conocidos. Niveles de homocisteína normales y curva de agregación plaquetaria que muestra hiperagregabilidad con Epinefrina. Actualmente en tratamiento con Rivaroxaban.

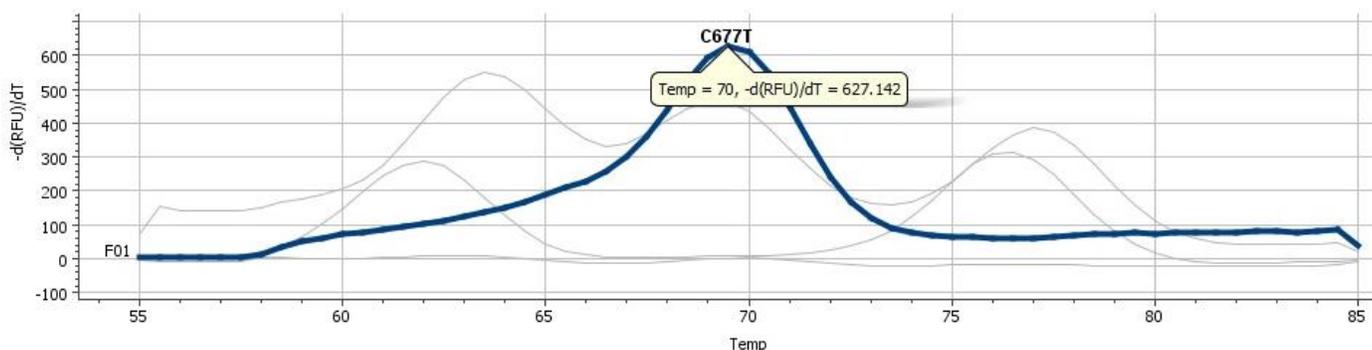


Figura 3. Curva de fusión de una mujer con la mutación C677T con **herencia homocigota** con diagnóstico de trombosis de vena porta a los 44 años de edad, conoce antecedentes en su familia de trombosis en miembros inferiores en abuelo paterno. En el momento del evento trombótico tomaba anticonceptivos orales. En su historia clínica reporta niveles de proteína C, S y antitrombina normales, igual que los niveles de homocisteína en suero e hiperagregabilidad plaquetaria con epinefrina en todas las concentraciones. Actualmente tratada con ASA de 70 mg.

La mutación en el gen A1298C fue la segunda en frecuencia con el 29,2%; sin embargo, solo se encontró un paciente (1,4%) homocigoto con diagnóstico de ACV, puesto que la

mayoría fueron heterocigotos (figuras 4 y 5). De los 21 pacientes con dicha mutación, 17 (81%) tenían reporte en su historia clínica de curva de agregabilidad plaquetaria, 6 de ellos presentaban hiperagregabilidad con epinefrina en todas las concentraciones, 7 con hiperagregabilidad plaquetaria con ADP y epinefrina en todas las concentraciones, y 4 con resultado normal. 11 de estos individuos presentaban niveles normales de homocisteína (tabla 5). Solo el 28% de los pacientes conocían eventos trombóticos en su familia, 42% aseguraban que no había antecedentes de trombosis, y el 30% no conocían manifestaciones de enfermedad trombótica en el resto de integrantes de su familia.

Tabla 5. Relación de las mutaciones de MTHFR con los niveles de homocisteína y los resultados de la curva de agregación plaquetaria.

	C677T		A1298C	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Homocisteína				
<i>Normal</i>	20	87	10	90,9
<i>Aumentado</i>	1	4,3	0	0
<i>Disminuido</i>	2	8,7	1	9,1
Agregometría				
<i>ADP</i>	0	0	0	0
<i>EPI</i>	13	39,4	6	35,3
<i>ADP y EPI</i>	11	33,3	7	41,2
<i>Negativo</i>	9	27,3	4	23,5

Intervalos biológicos de referencia Homocisteína en mujeres: 4.44-13.56 umol/L
Intervalos biológicos de referencia Homocisteína en Hombres: 5.46-16.20 umol/L

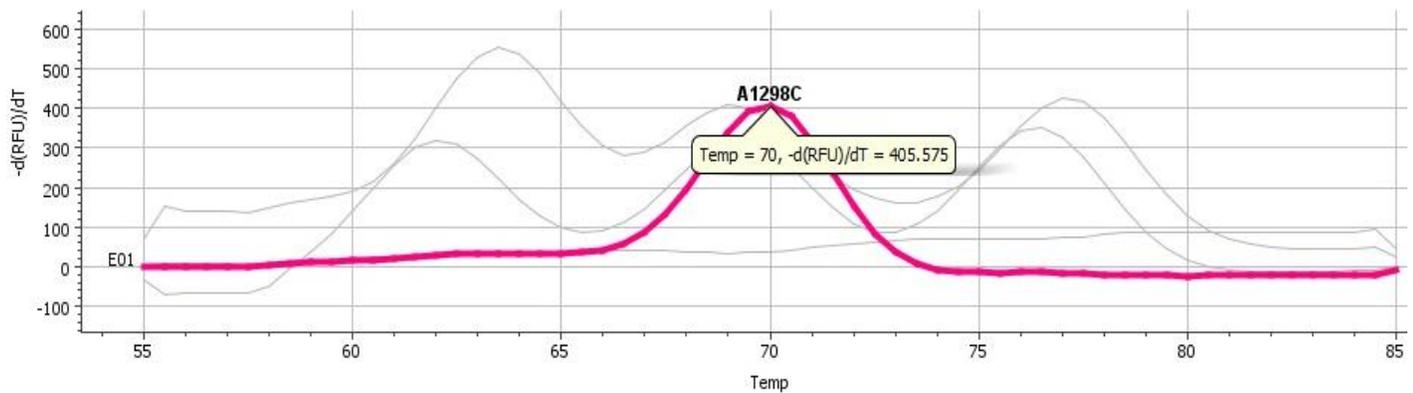


Figura 4. Curva de fusión de mutación A1298C **herencia heterocigota** de una mujer de 41 años de edad con trombosis venosa profunda, no conoce antecedentes familiares asociados a eventos tromboticos. Con niveles de homocisteina normales.

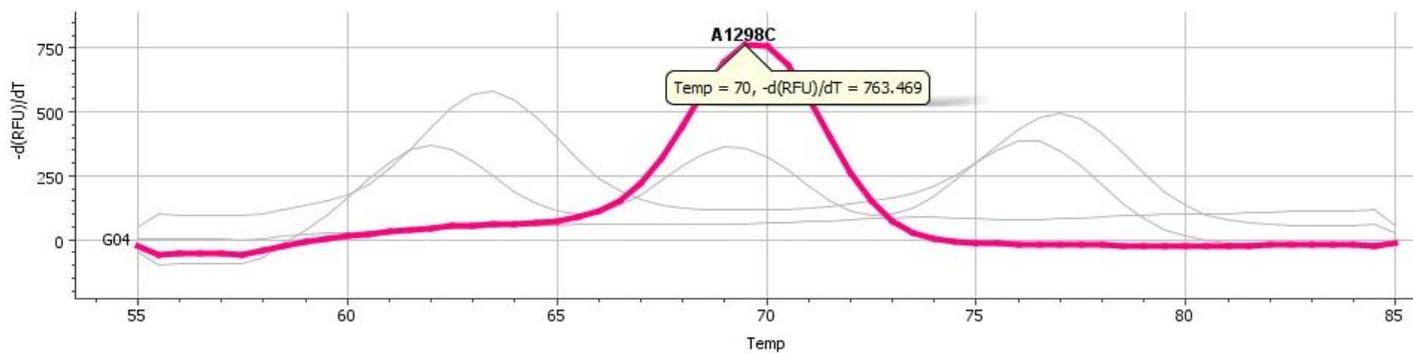


Figura 5. Curva de Fusión de mutación A1298C **herencia homocigota** de una mujer que, a sus 45 años de edad, presentó trombosis a nivel cerebral, que desencadenó accidente cerebrovascular. Es una paciente con obesidad, como factor de riesgo adicional. Presenta hiperagregabilidad con epinefrina, se desconocen los niveles de homocisteina.

De los 72 pacientes incluidos en este estudio, 10 (14%) presentaron las 2 mutaciones simultáneamente de la MTHFR, con manifestaciones como TVP, TEP y trombosis arterial, inclusive 2 mujeres, presentaron adicionalmente la mutación H1299R, una de ellas de 50 años con pronóstico desfavorable por presentar tromboembolismo pulmonar, y la otra de 31 años con trombosis venosa profunda en miembros inferiores (tabla 4).

La mutación R506Q (factor V de Leiden) solo se encontró en dos pacientes (2.8%) de forma heterocigota. Uno de ellos es un hombre de 44 años con diagnóstico de trombosis venosa profunda, que presenta 2 mutaciones más, a pesar de que en su familia no se han presentado otros casos de enfermedad tromboembólica, este individuo presenta una

severidad mayor, ya que la presencia de la mutación H1299R en pacientes con factor V de Leiden (figura 6), aumenta el riesgo para la expresión de la enfermedad (tabla 6). La manifestación clínica del segundo hombre que presentó la mutación fue trombosis retiniana a sus 32 años de vida, además de la mutación en el factor V, se detectó la mutación en la MTHFR A1298C de manera heterocigota, en su historia clínica se evidencia adicionalmente, disminución en los niveles de Antitrombina y de Proteína C.

Tabla 6. Distribución de las mutaciones del gen del factor V incluidos en este estudio.

Patología	H1299H		H1299R		R506R		R506Q	
	n	%	n	%	n	%	n	%
TVP	22	84,6	4	15,4	25	96,2	1	3,8
ACV	12	70,6	5	29,4	16	94,11	1	5,88
TEP	7	58,3	5	41,7	12	100,0	0	0,0
Trombosis arterial	6	85,7	1	14,3	7	100,0	0	0,0
Trombosis en estudio	4	80,0	1	20,0	5	100,0	0	0,0
Trombosis de vena porta	3	100,0	0	0,0	3	100,0	0	0,0
Trombosis arterial y venosa	2	10,0	0	0,0	2	100,0	0	0,0

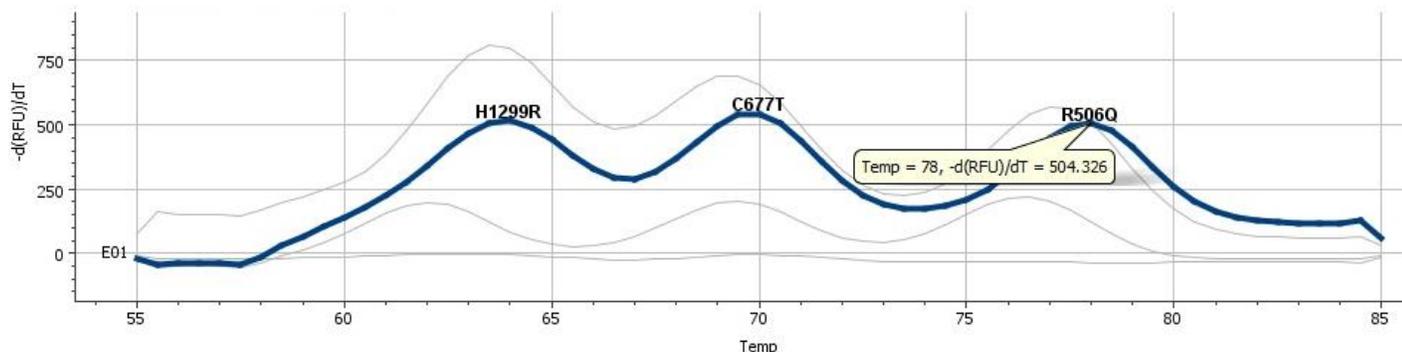


Figura 6. Curva de fusión de hombre de 44 años, con 3 mutaciones simultáneas, quien presenta episodio de trombosis venosa profunda, actual tratamiento con aspirina 70 mg. Sin antecedentes familiares de eventos trombóticos. Curva de agregación plaquetaria normal. Presenta 3 mutaciones asociadas a trombofilias, dos en el factor V y una en MTHFR, con herencia heterocigota.

La mutación H1299R en el gen del factor V, se encontró en 16 individuos (22.2%), hallazgo muy importante ya que, en nuestra población colombiana, no ha sido reportado (tabla 3). 10 individuos presentaban concomitancia con otras mutaciones, como R506Q, A1298C y/o C677T. Del total de la población con dicha mutación, solo un individuo

presentó homocigosidad, adicionalmente con detección de la mutación A1298C y su manifestación trombótica fue TVP (figuras 7 y 8).

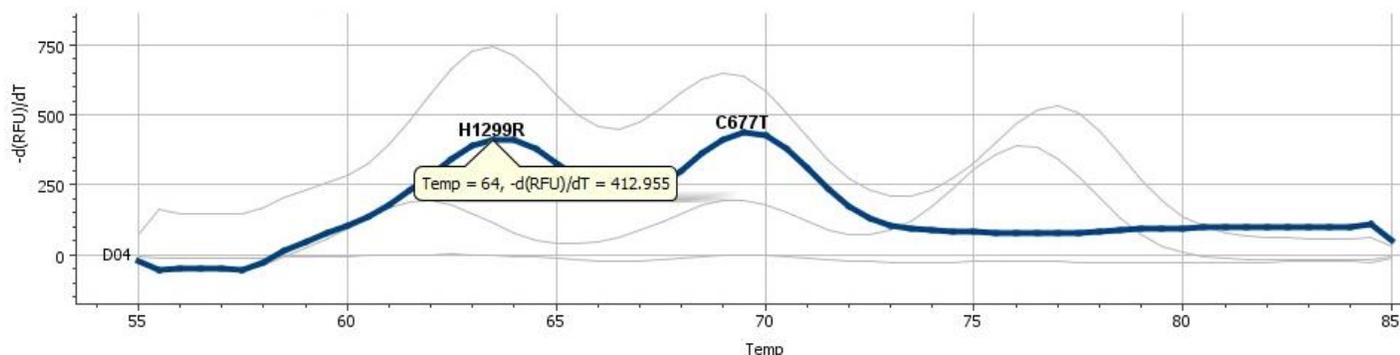


Figura 7. Curva de fusión que demuestra la presencia de las mutaciones H1299R y C677T **herencia heterocigota**, en un joven que, a sus 24 años de edad, presentó trombosis de vena subclavia axilar, con pronóstico desfavorable, quien continúa en tratamiento con Warfarina después de 2 años del episodio trombótico. En su historia clínica se evidenciaban niveles de proteína C y proteína S normales y curva de agregación plaquetaria normal.

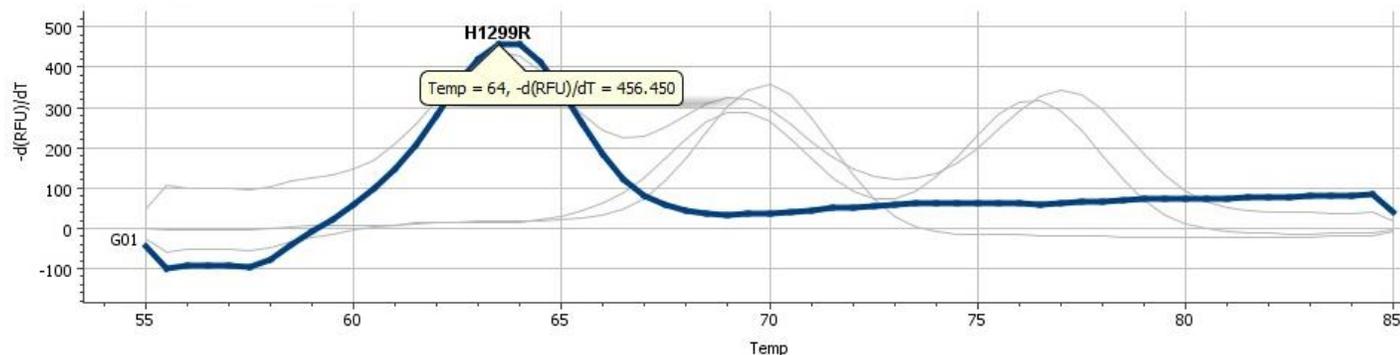


Figura 8. Curva de fusión de una mujer de 45 años con la mutación H1299R **herencia homocigota**, presenta diagnóstico de trombosis venosa profunda de miembros inferiores, con disminución en los niveles de proteína C y S, adicional a esto presenta la mutación 1298C (dato no mostrado) pero con herencia heterocigota. El pronóstico de la paciente es desfavorable.

La distribución de esta mutación se encontró en las diferentes manifestaciones clínicas como TVP, TEP, ACV, inclusive en un individuo que presentaba adicionalmente la mutación C677T, sufrió Infarto agudo de miocardio posterior a trombosis arterial. Solo 5 individuos conocían antecedentes familiares asociados a eventos trombóticos.

En la historia clínica de los pacientes con la mutación H1299R, solo 2 tenían reportes de resistencia a proteína C, los cuales estaban normales, 2 presentaban disminución en la actividad de la proteína C y 3 con disminución en los niveles de proteína S total.

De las 6 mutaciones, incluidas en este estudio, Y1702C en el factor V y G20210A en el factor II no se detectaron en ninguno de los individuos de esta investigación. (tabla 3).

Discusión:

La teoría de trombofilia ha evolucionado con el desarrollo de investigaciones que demuestran la asociación entre las manifestaciones trombóticas y las mutaciones en el sistema anticoagulante natural, en los factores de la coagulación e inclusive en la enzima MTHFR (53, 54, 55). En la actualidad la enfermedad tromboembólica se considera multifactorial, donde participan factores hereditarios y ambientales y que no necesariamente las causas genéticas siguen una herencia mendeliana simple, ya que la suma de múltiples mutaciones en distintos genes y el grado de penetrancia, pueden determinar en cada individuo el grado de susceptibilidad a desarrollar trombosis (56).

Lo anterior se correlaciona con en el presente estudio, donde se evidenció que 17 (23.6%) individuos portaban 2 mutaciones y 3 (4%) presentaban 3 mutaciones asociadas a trombofilias, estos individuos presentaban manifestaciones más severas. Una de las mujeres que presentó 3 mutaciones sufrió tromboembolismo pulmonar, con detección de las dos mutaciones en MTHFR (C677T y A1298C) y con una mutación en el factor V (H1299R), 3 familiares de esta paciente también participaron de este estudio, su hermano quien presentó solo dos mutaciones C677T y H1299R al igual que su sobrina, y su padre quien desde temprana edad ha sufrido de varios episodios trombóticos severos hasta llevar a la amputación de los dos miembros inferiores, él relata que dos de sus hermanos también sufrieron de trombosis venosa profunda y consecuentemente sus extremidades inferiores también fueron amputadas, extrañamente este individuo solo presentó la mutación C677T, esto sugiere, que posiblemente hay un patrón genético adicional que acompaña esta familia en el sistema de la coagulación no estudiado en esta investigación. Y Como se mencionó anteriormente existen otros factores adicionales que pueden estar involucrados en el desarrollo trombótico, que pueden acompañar a los pacientes con manifestaciones tan severas como las presentadas en esta familia, inclusive que pueden participar como un segundo golpe para la generación de trombos, dentro de estos se incluyen factores ambientales que alteran la calidad de vida, como fumar, consumir alcohol, obesidad, el sedentarismo, inclusive stress psico-social en países desarrollados. Todas estas condiciones

que afectan la hemostasia se asocian con inflamación endotelial, hipercoagulabilidad, hipofibrinólisis y aumento en la reactividad plaquetaria y que si van acompañados de una o más mutaciones asociadas a trombofilia pueden llevar al desarrollo de cualquier evento trombótico (57).

Giuseppe Lippi en un artículo publicado en 2018, evidenció que la distinción de la trombosis venosa y arterial es un teoría cuestionable, es claro que la agregación plaquetaria es mayor en lugares de fuerte turbulencia promoviendo la generación de trombos blancos a nivel arterial y que a nivel venoso los trombos retienen eritrocitos y forman el trombo rojo, pero a pesar de ello, los dos tipos de trombos están compuestos por fibrina, acompañada de células sanguíneas incluyendo eritrocitos, plaquetas y leucocitos y la única variación es la cantidad de dichas células en los dos tipos de trombos y su generación depende de factores como condiciones genéticas, funcionalidad proteica y el medio ambiente. Lo anterior tiene una implicación importante en el diagnóstico y en el tratamiento de los pacientes, por ejemplo, un individuo con infarto agudo de miocardio puede tener trombos intracoronarios tanto blancos como rojos. Por otro lado, las plaquetas también son componentes importantes en los trombos venosos, por tal motivo el tratamiento en trombosis venosa debe incluir como complemento el uso de antiagregantes como la aspirina (58).

Estas aseveraciones, se ven reflejadas en este estudio; ya que la fisiopatología de las mutaciones en el factor V, sugieren manifestaciones trombóticas venosas, pero de los 16 individuos con la mutación H1299R, 6 presentaron trombosis arterial, de los cuales 5 (31%) fueron diagnosticados con accidente cerebrovascular y 1 (6%) presentó infarto agudo de miocardio. Y de los 2 individuos con la mutación R506Q, 1 cursó con accidente cerebrovascular.

Así mismo se evidenció con las mutaciones en la enzima MTHFR, las cuales han mostrado su patogenia a nivel arterial, sin embargo, de los 49 pacientes con la mutación C677T 27 (55%) han sufrido eventos trombóticos a nivel venoso, manifestándose tromboembolismo pulmonar, trombosis venosa profunda y trombosis de vena porta.

De estos individuos solo 1 tenía reporte en su historia clínica de aumento de homocisteína, a pesar de ser un dato no estadísticamente significativo dado el número bajo de individuos con este dato, se relaciona con investigaciones donde no encuentran relación entre los

niveles de homocisteína y las mutaciones en la enzima MTHFR en pacientes con sintomatología trombótica (42, 43).

La mutación H1299R, se detectó en el 22% de la población estudiada, información muy valiosa para el conocimiento de la distribución genotípica asociada a trombofilia en Colombia, ya que no existen más investigaciones que evalúen la frecuencia de dicha variante del factor V en este país. En Italia (59) y en el medio oriente, en países como Irán (60) y Líbano (61), se ha evaluado la asociación de H1299R con eventos trombóticos ya que su patogenia está relacionada con resistencia a la proteína C de forma moderada y se conoce como un factor de riesgo de trombosis por si sola o en asociación con el factor V de Leiden. Además, en países desarrollados como Estados Unidos se incluye la detección de esta mutación en el diagnóstico de todo paciente que padece trombosis venosa profunda. En nuestro país, no se realiza como prueba de rutina en el diagnóstico de pacientes con eventos trombóticos, esto puede deberse a que no hay estudios que apoyen su existencia en la población general, enferma o con antecedentes familiares de dicha trombofilia.

De los individuos estudiados con la mutación H1299R, 2 tenían reporte normal de resistencia a la proteína C, pero no hay reporte de este dato en los demás pacientes con dicha mutación, por tal motivo, el desconocimiento de esta información no permite realizar asociación entre estas dos variables.

En la población estudiada, no se detectó la mutación G20210A en el factor II de la coagulación, a pesar de ello, investigaciones realizadas por algunos autores como Torres y colaboradores en 2006 (62) y Baena y colaboradores en 2018 (63) han reportado dicha variación genética en el 4% de pacientes con padecimientos trombóticos en la población colombiana. Este resultado puede estar influenciado por condiciones como la gran heterogeneidad étnica que lleva a la variación de mutaciones asociadas a trombofilias en las diferentes regiones de Colombia. Además, con el fin de poder visualizar la frecuencia de esta mutación se sugiere realizar estudios a gran escala que incluya un n muestral mayor de 100.

La detección de los polimorfismos presentes en los eventos tromboembólicos en pacientes menores de 50 años, cada vez tiene mayor importancia en el diagnóstico y consecuentemente en el tratamiento de la enfermedad, el uso de herramientas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, confiere gran ventaja sobre las pruebas rutinarias donde se busca niveles presentes en plasma de los factores de la coagulación, estas pruebas pueden alterarse con el consumo de medicamentos, con el ayuno, con el ejercicio y solo se realizan en pacientes enfermos. Por el contrario, con la demostración de las variantes genéticas en individuos con historia familiar trombótica, se puede tener información acerca de la predisposición al desarrollo de cualquier estado de hipercoagulabilidad, de esta manera el clínico puede intervenir y aplicar medicina preventiva para buscar reducir la expresión fenotípica de las trombofilias heredadas (64).

A pesar de ello, en Colombia para el diagnóstico de trombofilia no se incluye la totalidad de las mutaciones estudiadas en esta investigación, en el sistema de salud y en el Plan de Beneficios en Salud con cargo a la Unidad de Pago por Capitación (PBSUPC) hacen parte las pruebas moleculares para la detección de las mutaciones en la enzima MTHFR, C677T y A1298C, el factor V de Leiden R506Q y la mutación G20210A en el factor II, no obstante, como se mencionó anteriormente, el estudio de la mutación H1299R y de Y1702C se excluyen, por tanto se corre el riesgo de diagnósticos errados o incompletos que consecuentemente pueden afectar el pronóstico y la evolución de los pacientes con trombosis tanto venosa como arterial.

En conclusión, se requieren más estudios en Colombia que demuestren la distribución genotípica de la mutación H1299R y su comportamiento y relación con las demás mutaciones asociadas a trombofilia y de esta manera incluirla dentro del panel realizado a los pacientes con eventos trombóticos para su diagnóstico y mejor seguimiento de su enfermedad. *Anyplex II Thrombosis SNP Panel Assay*®, es una técnica molecular con una alta especificidad y sensibilidad que se convierte en una herramienta segura y con alta reproducibilidad para el uso en el diagnóstico de trombofilias ya que incluye el análisis y detección de las 6 mutaciones estudiadas en esta investigación.

Bibliografía:

1. Zarrouk M, Salim S, Elf J, Gottsäter A, Acosta S. Testing for thrombophilia in mesenteric venous thrombosis – Retrospective original study and systematic review. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017;31(1):39-48.
2. Lippi G, Favaloro EJ. Venous and Arterial Thromboses: Two Sides of the Same Coin?. *Semin Thromb Hemost*. 2018; 44:239-248.
3. Sader N, Lotbinière-Bassett M, Tso MK, Hamilton M. Management of Venous Sinus Thrombosis. *Neurosurg Clin N Am* (2018); 29: 585–594.
4. Louis-Jacques AF, Maggio L, Romero ST. Prenatal Screening for Thrombophilias. *Clin Lab Med*. 2016;36(2); 421-434.
5. Dabiri G, Damstetter E, Chang Y, Baiyee Ebot E, Powers JG, Phillips T. Coagulation disorders and their cutaneous presentations. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74(5): 783-792.
6. Nakashima MO, Rogers HJ. Hypercoagulable states: An algorithmic approach to laboratory testing and update on monitoring of direct oral anticoagulants. *Blood Res*. 2014;49(2): 85-94.
7. Cuervo HH, Usme S, Yunis JJ. Genotipos frecuentemente asociados a trombofilias. *Biomédica* 2014; 34:132-142.
8. Lippi G, Franchini M. Pathogenesis of venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34:747-61
9. Gallo Sn, Durán lf, Molano vm, Núñez na. Evaluación de la estrategia educativa para fortalecer el uso de la guía de tromboprofilaxis en un hospital de Colombia. *Acta Med Colomb* 2015;40: 24-29.
10. Montagnana M, Lippi G, Danese E. An Overview of Thrombophilia and Associated Laboratory Testing. *Methods Mol Biol* 2017;1646:113-135.
11. Bremme K, Lundgren Hinnerdal S, Hallstrom SS, Chaireti R. Risk factors and obstetric outcomes in pregnancies complicated by pelvic vein thrombosis, and in the subsequent pregnancy. *Thrombosis Research*. 2018; 168: 14-147
12. Tinholt M, Sandsetb PM, Iversena N. Polymorphisms of the coagulation system and risk of cáncer. *Thrombosis Research* 2016; S49–S54.
13. Silver RM, Saade GR, Thorsten V, Parker CB, Reddy UM, Drews-Botsch C, et al.

- Factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylene tetrahydrofolate reductase mutations and stillbirth. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;215(4): 468.e1-a68. E17.
14. Revilla N, de la Morena-Barrio ME, Miñano A, López-Gálvez R, Toderici M, Padilla J, et al. Transient desialylation in combination with a novel antithrombin deficiency causing a severe and recurrent thrombosis despite anticoagulation therapy. *Sci Rep.* 2017;7: 1-9.
 15. Bosler D, Mattson J, and Crisan D. Genotype HP, Bosler D, Mattson J, Crisan D. Phenotypic Heterogeneity in Patients with homozygous Prothrombin 20210AA Genotype. *J Mol Diagn.* 2006; 8(4): 420–425.
 16. Gandara E, Barboza AG, Vazquez F. Prevalence of prothrombin G20210A mutation in patients with atrial fibrillation. *Thromb Res.* 2016;147; 7-9.
 17. Liu X, Jiang Y, Russell JE. A potential regulatory role for mRNA secondary structures within the prothrombin 3'UTR. *Thromb Res.* 2010;126(2): 130-136.
 18. Lippi G, Favaloro EJ. Venous and Arterial Thromboses: Two Sides of the Same Coin?. *Semin Thromb Hemost.* 2018;44(3):239-248
 19. Dahlbäck B Pro- and anticoagulant properties of factor V in pathogenesis of thrombosis and bleeding disorders. *Int J Lab Hematol.* 2016; 1:4-11.
 20. Dahlbäck B. Novel insights into the regulation of coagulation by factor V isoforms, tissue factor pathway inhibitor α , and protein S. *J Thromb Haemost.* 2017;15(7):1241-1250.
 21. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H Mutation in blood coagulation associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994; 369:64-67.
 22. Franco RF, Maffei FH, Lourenco D, Morelli V, Thomazini IA, Piccinato CE, et al. Factor V Arg306-->Thr (factor V Cambridge) and factor V Arg306-->Gly mutations in venous thrombotic disease. *Br J Haematol.* 1998;103:888-90.
 23. Mumford AD, McVey JH, Morse CV, et al. Factor V I359T: a novel mutation associated with thrombosis and resistance to activated protein C. *Br J Haematol* 2003; 123: 496–501.
 24. Otrock ZK, Taher AT, Shamseddeen WA, Zaatari G, Bazarbachi A, Mahfouz RA. Factor V HR2 haplotype: a risk factor for venous thromboembolism in individuals

- with absence of Factor V Leiden. *Ann Hematol.* 2008;87:1013-1016.
25. Faisel F, Romppanen EL, Hiltunen M, Helisalme S, Laasanen J, Punnonen K, et al. Susceptibility to preeclampsia in Finnish women is associated with R485K polymorphism in the factor V gene, not with Leiden mutation. *Eur J Hum Genet.* 2004;12:187-91.
 26. Castoldi E, Simioni P, Kalafatis M, Lunghi B *Blood.* Combinations of 4 mutations (FV R506Q, FV H1299R, FV Y1702C, PT 20210G/A) affecting the prothrombinase complex in a thrombophilic family. 2000;15;96(4):1443-8
 27. Hiyoshi M, Hashimoto S, Tagawa S, Arnutti P, Prayoonwiwat W, Tatsumi N. A Thai patient with the mutation of Arg306 of FV gene identical to the Hong Kong but not to the Cambridge type. *Thromb Haemost.* 1999;82:1553-1554.
 28. Izuhara M, Shinozawa K, Kitaori T, Katano K, Ozaki Y, Fukutake K, et al. Genotyping analysis of the factor V Nara mutation, Hong Kong mutation, and 16 single-nucleotide polymorphisms, including the R2 haplotype, and the involvement of factor V activity in patients with recurrent miscarriage. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2017;28(4):323-328.
 29. Kjellberg U, Van Rooijen M, Bremme K, Hellgren M. Factor v Leiden mutation and pregnancy-related complications. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203(5): 469.e1-8.
 30. Gessoni G, Valverde S, Valle L, Gessoni F, Caruso P, Valle R. Lack of rivaroxaban influence on a prothrombinase-based assay for the detection of activated C protein resistance: an Italian ex vivo and in vitro study in normal subjects and factor V Leiden carriers. *Blood Transfus.* 2017;15(6): 562–567.
 31. Reddy UM, Drews-botsch C, Conway D, Coustan D. Factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylene tetrahydrofolate reductase mutations and stillbirth: the Stillbirth Collaborative Research Network. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;215(4):468.e1-468.e17.
 32. Van Ommen, C. H., & Nowak-Göttl, U. Inherited Thrombophilia in Pediatric Venous Thromboembolic Disease: Why and Who to Test. *Frontiers in Pediatrics,* 2017;5:1-6
 33. Akar N. Determination of Factor V Leiden Mutation and R2 Polymorphism in Cis Position. 2013;19(6):685-688.

34. Castoldi E¹, Lunghi B, Mingozi F, Muleo G, Redaelli R, Mariani G, Bernardi F. Population A missense mutation (Y1702C) in the coagulation factor V gene is a frequent cause of factor V deficiency in the I. A missense mutation (Y1702C) in the coagulation factor V gene is a frequent cause of factor V deficiency in the Italian population. *Haematologica*. 2001;86(6):629-33.
35. Butkowski EG, Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Interaction of homocysteine, glutathione and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in metabolic syndrome progression. *Clin Biochem*. 2017;50(3):116-120.
36. Mrad M, Ibrahim H, Akremi I. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) (C677T and A1298C) Polymorphisms and Vascular Complications in Patients with Type 2 Diabetes. *Can J Diabetes*. 2017;41:339-464.
37. Ventura P, Venturelli G, Marcacci M, Fiorini M, Marchini S, Cuoghi C, et al. Hyperhomocysteinemia and MTHFR C677T polymorphism in patients with portal vein thrombosis complicating liver cirrhosis. *Thromb Res*. 2016; 141:189-95.
38. Koroush K. Gang C. Seyedabbas M. Bahar K. Yin W. Wuqiang F. Opposite impact of Methylene tetrahydrofolate reductase C677T and Methylene tetrahydrofolate reductase A1298C gene polymorphisms on systemic inflammation. *J Clin Lab Anal*. 2018; e22401.
39. Mrad M, Ibrahim H, Akremi I, et al. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) (C677T and A1298C) Polymorphisms and Vascular Complications in Patients with Type 2 Diabetes. *Can J Diabetes*. 2017;41(4):366-371.
40. Basol N, et al. The importance of MTHFR C677T/A1298C combined polymorphisms in pulmonary embolism in Turkish population. *Medicina* 2016:1-6.
41. Y. Nadir & R. Hoffman & B. Brenner. Association of homocysteine, vitamin B12, folic acid, and MTHFR C677T in patients with a thrombotic event or recurrent fetal loss. *Ann Hematol* 2007;86:35-40.
42. Ortega I, Estrada G, Guzmán M. La mutación 677 C>T en la 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa y el aumento de homocisteína en pacientes mexicanos con un estado de trombofilia. *Med Int Mex* 2007;23:15-18.
43. Khimani F, Perrotta P, Hobbs G, Hogan T. Non-Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Polymorphisms with

- Homocysteine Levels, Venous or Arterial Thromboses in 1,141 North-Central Appalachian Patients. *Cancer and Clinical Oncology*; 2016(5)2:21-28.
44. Camacho O, Giusti B, Restrepo CM, Abbate R, Pepe G. Frequency of factor V (FV) Leiden and C677T methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in Colombians. *Thromb Haemost.* 1998;79(4):883-884.
 45. Torres JD, Cardona H, Alvarez L, Cardona W, Castaneda SA, Quintero-Rivera F. Inherited thrombophilia is associated with deep vein thrombosis in a Colombian population. *Am J Hematol.* 2006; 81:933-937.
 46. Çiftdoğan, Dilek Y; Coşkun, Şenol; Ulman, Cevval; Tkz, Hakan: The Factor V G1691A, Factor V H1299R, prothrombin G20210A polymorphisms in children with family history of premature coronary artery disease *Coronary Artery Disease*: November 2009;20(7): 435-439.
 47. Basol N, Karakus N, Yasemen A, Kaya I, Karakus K, Yigit S. ScienceDirect The importance of MTHFR C677T / A1298C combined polymorphisms in pulmonary embolism in Turkish population. *Medicin.* 2016(52)1: 35-40.
 48. Lussana F, Betti S, D'Angelo A, De Stefano V, Fedi S, Ferrazzi P. Evaluation of the prevalence of severe hyperhomocysteinemia in adult patients with thrombosis who underwent screening for thrombophilia. *Thromb Res.* 2013;132-136.
 49. Abbott mSample Prep System DNA (4 X 24 Preps). Safety Data Sheet. V.2014 <https://www.promega.com/resources/msds/msdss/md2000/md2000>.
 50. <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual
 51. Lee DH. TOCE: Innovative Technology for High Multiplex Real-time PCR. *Seegene Bulletin.* 2012(1): 5-10.
 52. Chun JY. [High Multiplex Molecular Diagnostics.] *Seegene Bulletin.* 2012(1): 1-4.
 53. Middeldorp, S. Inherited thrombophilia: a double-edged sword. *Hematology,* 2016(1): 1–9.
 54. Rosendaal F, Vandenbroucke JY, Bertina R. Factor V Leiden: the venous thrombotic risk in thrombophilic families. *British Journal of Haematology* 2000; 939-945.

55. Isotalo, P, Donnelly, J. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase mutations in patients with venous thrombosis. *Molecular Diagnosis*, 2000; 5(1), 59–66.
56. Saadatnia M, Salehi M, Movahedian A, Shariat SZ, Salari M. Factor V Leiden, factor V Cambridge, factor II GA20210, and methylenetetrahydrofolate reductase cerebral venous and sinus thrombosis: A case-control study. *J Res Med Sci*. 2015; 20(6):554-562.
57. Valencia-Nuñez, D. M., Kreutler, W., Moya-Gonzalez, J., Alados-Arboledas, P., Muñoz-Carvajal, I., Carmona, A. Endothelial vascular markers in coronary surgery. *Heart and Vessels*, 2017; 32(11), 1390–1399.
58. Favaloro, E., & Lippi, G. Venous and Arterial Thromboses: Two Sides of the Same Coin? *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2018: 44(03), 239–248.
59. Castoldi E, Simioni P, Kalafatis M, Lunghi B. Combinations of 4 mutations (FV R506Q, FV H1299R, FV Y1702C, PT 20210G/A) affecting the prothrombinase complex in a thrombophilic family. *Blood*, 2000; 96 (4): 1443-1448.
60. Arabkhazaeli N, Ghanaat K, Bagher HS, H1299R in coagulation Factor V and Glu429Ala in MTHFR genes in recurrent pregnancy loss in Sari, *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2016; 14(5): 329–334.
61. Otrrock, ZK., Taher, AT., Shamseddeen, WA., Zaatari, G., Bazarbachi, A, Mahfouz RA. Factor V HR2 haplotype: a risk factor for venous thromboembolism in individuals with absence of Factor V Leiden. *Annals of Hematology*, 2008; 87(12), 1013–1016.
62. Torres JD, Cardona H, Álvarez L, Cardona-Maya W, Castañeda SA, Quintero-Rivera F, et al. Inherited thrombophilia is associated with deep vein thrombosis in a Colombian population. *Am J Hematol*. 2006;81(12):933-7.
63. Baena J, Murcia AM , Franco A , Moreno I. Factor v leiden y otras trombofilias, frecuencia en un centro de alta complejidad de cali (Colombia). *Revista colombiana de hematología y oncología*. 2018; 5 (1): 42-49
64. Fountoglou, N., Petropoulou, M., Iliadi, A. Two-panel molecular testing for genetic predisposition for thrombosis using multi-allele visual biosensors. *Anal Bioanal Chem* 2016(408): 1943-1952.

Formato de recolección de datos

 <p>UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA 1803</p>	<p>Análisis de las mutaciones en los factores II y V de la coagulación y en la metiltetrahidrofolato reductasa en pacientes con trombofilia atendidos en Dinámica IPS en Medellín entre 2017-2018</p>	 <p>dinámica Especialistas en ayudas diagnósticas</p>
Institución:		Número historia Clínica:
Nombre completo del paciente:		
Documento de identidad:	Edad:	Sexo: F___ M___
Teléfono:	Dirección:	
Departamento:	Ciudad:	
Ocupación:	Raza:	
Ha presentado alguna alteración en la coagulación:		
Cuál es el diagnóstico de su enfermedad :		
Se encuentra en tratamiento actualmente: SI___ NO___	Cual:	
Ha recibido tratamientos anteriores: SI_ NO__	Cual:	
Ha sido sometido a algún tipo de cirugía NO:___SI:___Cual:_____		
Ha estado hospitalizado SI___ No___		Por qué?
¿Alguien en su familia presenta o ha presentado algún trastorno en la coagulación?		
SI___ NO___ QUIEN_____ Síntomas: _____		
Diagnóstico: _____		
Resultados de otros estudios: _____ _____		
Observaciones:		

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
Escuela de Microbiología
Grupo Hematopatología molecular
Informe de Consentimiento informado

Análisis de mutaciones en los factores II y V de la coagulación y en la metiltetrahidrofolato reductasa en pacientes con trombofilia atendidos en Dinámica IPS en Medellín entre 2017-2018

Sitio donde se realizará el estudio: Dinámica IPS Medellín

Entidad que respalda la investigación: Universidad de Antioquia, Grupo de Hematopatología molecular. Dinámica IPS

Entidad que patrocina la Investigación: Dinámica IPS, Casa comercial ANNAR

Nombre del paciente:

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación clínica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado, y busca darle a entender las características del estudio. Dicho consentimiento informado está basado en la siguiente normativa internacional: *Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos*, *Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de la Organización Mundial de la Salud* y *Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos*.

Si luego de leer este documento tiene alguna duda, siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude al buen entendimiento de la investigación.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

Si el paciente decide participar, se le solicitará autorización para tomar datos clínicos personales y de laboratorio a partir de la historia clínica.

Objetivo del estudio

Analizar las mutaciones en los factores II y V de la coagulación y en la enzima metiltetrahidrofolato reductasa en pacientes con trombofilia atendidos en Dinámica IPS en Medellín entre 2017 – 2018.

Importancia del estudio:

El conocimiento de las causas hereditarias de las trombofilias cada vez tiene mayor importancia en el diagnóstico, en el tratamiento de la enfermedad y a su vez en la severidad de esta. El uso de herramientas moleculares confiere gran ventaja sobre las pruebas rutinarias. Por tanto, se espera desarrollar esta investigación que incluirá el análisis de todas las mutaciones en los factores II y V de la coagulación y en la enzima MTHFR y así obtener datos que puedan tener mayor impacto clínico, en el seguimiento y tratamiento de los pacientes con enfermedades en la coagulación.

Riesgos y beneficios:

Los riesgos para la realización de la investigación son mínimos debido que se tomará una muestra de sangre en tubo tapa EDTA en Dinámica IPS

Su participación en la investigación no le generará gastos adicionales y su manejo dentro de su Institución clínica seguirá el protocolo normal. Los participantes no recibirán ningún beneficio económico por participar en este estudio, el cual adolece de cualquier interés económico por parte de nuestra institución, fuera de darle desarrollo a la investigación básica.

Derechos

Los registros que lo puedan identificar serán mantenidos confidencialmente hasta donde permitan las leyes colombianas y las normas de Buenas Prácticas Clínicas en investigación. Estos registros pueden ser examinados por monitores, auditores y/o autoridades de salud o reguladoras. Su nombre no aparecerá en ningún reporte de este estudio.

La participación en esta investigación es completamente voluntaria. El paciente puede elegir si desea participar o no en el estudio, en caso de aceptar puede retirarse en cualquier momento del estudio sin recibir ninguna represalia por parte del grupo de investigadores de La Universidad de Antioquia.

Su participación en el proceso de selección le da derecho a conocer los resultados derivados del estudio, a poseer una copia del presente documento y a que se le respondan satisfactoriamente todas las preguntas que surjan en el transcurso del mismo.

Frente a cualquier inquietud adicional sobre el estudio, el sujeto de estudio podrá contactar a la investigadora principal Carolina Jaramillo Jaramillo en la dirección electrónica: carolina.jaramillo@udea.edu.co.

Con su firma certifica que ha leído o le han leído el presente formato de consentimiento informado, que le han sido resueltas sus preguntas a satisfacción y que acepta de manera voluntaria participar en el presente estudio.

Procedimiento del estudio

1. Los participantes serán previamente seleccionados según los criterios de inclusión y de exclusión.
2. Se tomarán una muestra de sangre en un tubo tapa EDTA
3. Finalización del proceso: las muestras obtenidas se utilizarán para la determinación mutaciones en los factores II, V y en la enzima metiltetrahidrofolato reductasa.

Confidencialidad del participante.

Las únicas personas que sabrán que usted participó en el estudio somos los miembros del equipo de investigación. Nosotros no divulgaremos ninguna información sobre usted, o proporcionada por usted durante la investigación. Tanto las encuestas como las muestras sanguíneas estarán marcadas con códigos de barras.

Cuando los resultados de la investigación se publiquen o se discutan en conferencias, no se incluirá información que pueda revelar su identidad.

Aclaraciones finales

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada donante, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído y escuchado satisfactoriamente las explicaciones sobre este estudio y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Estoy enterado(a) de las incomodidades riesgos y beneficios potenciales de participar en este estudio y sé que puedo retirarme de él en cualquier momento. Autorizo el uso de los registros médicos y de la muestra de laboratorio para los propósitos de esta investigación.

Al firmar este documento de consentimiento, no estoy renunciado a ninguno de los derechos legales que yo tendría de otra manera como sujeto en un estudio de investigación.

Yo estoy de acuerdo en participar en este estudio.

Nombre: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Nombre Testigo imparcial: _____

Firma Testigo imparcial: _____

Dirección: _____

Grado de Parentesco con el voluntario: _____

Nombre Testigo imparcial: _____

Firma Testigo imparcial: _____

Fecha: _____

Dirección: _____

Grado de Parentesco con el voluntario: _____

Persona que conduce el consentimiento

A lo mejor de mi conocimiento, el participante entiende los procedimientos, riesgos y beneficios implicados en participar en este estudio.

Nombre del investigador: _____

Firma del investigador: _____

Fecha _____