

Euillades, Adriana Celia

**Análisis de los polimorfismos factor
V Leiden y protrombina G20210A en
pacientes estudiados para
trombofilia en un Hospital Público
de Mendoza Argentina**

**Tesis para la obtención del título de posgrado de
Especialista en Bioquímica Clínica, Área
Hematología**

Directora: Kuri, Nora Isabel

Documento disponible para su consulta y descarga en Biblioteca Digital - Producción Académica, repositorio institucional de la Universidad Católica de Córdoba, gestionado por el Sistema de Bibliotecas de la UCC.



[Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.](#)

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Químicas

ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS FACTOR V LEIDEN Y
PROTROMBINA G20210A EN PACIENTES ESTUDIADOS PARA
TROMBOFILIA EN UN HOSPITAL PÚBLICO DE MENDOZA
ARGENTINA.

Trabajo Final de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Católica de
Córdoba conforme a los requisitos para obtener el título de Especialista en Bioquímica
Clínica, Área Hematología

por

EUILLADES, Adriana Celia

Director del Trabajo Final:

Bioquímica Especialista en Hematología Nora Isabel Kuri

Hospital Central de Mendoza

Codirector del Trabajo Final:

Doctor Néstor Soria

Universidad Católica de Córdoba

Comisión Evaluadora:

- Bioquímica Especialista Silvia Ghione
- Bioquímica Especialista Marysel Olmedo
- Doctor Miguel Orsilles

Universidad Católica de Córdoba

ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS FACTOR V LEIDEN Y PROTROMBINA G20210A EN PACIENTES ESTUDIADOS PARA TROMBOFILIA EN UN HOSPITAL PÚBLICO DE MENDOZA ARGENTINA.

Agradecimientos

- ✓ A mi familia
- ✓ A mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Hematología del Hospital Central de Mendoza.
- ✓ A los médicos y enfermeras del Servicio de Hematología del Hospital Central de Mendoza.
- ✓ A mis compañeros de cursado y profesores de la Especialidad en Hematología de la Universidad Católica de Córdoba.

ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS FACTOR V LEIDEN Y PROTROMBINA G20210A EN PACIENTES ESTUDIADOS PARA TROMBOFILIA EN UN HOSPITAL PÚBLICO DE MENDOZA ARGENTINA.

Índice General

Índice Abreviaturas	7	3.1. Tipo de estudio	23
Índice de Figuras	9	3.2. Población estudiada	24
Índice de tablas	10	3.3. Criterios de inclusión y exclusión	24
Resumen:	11	3.4. Procedimiento	24
1. Introducción:	12	3.4.1. Obtención de las muestras	24
1.1. Factor V	13	3.4.2. Extracción de ADN	25
1.1.1. Gen que codifica al Factor V	14	3.4.3. Análisis genético	25
1.1.2. Funciones del Factor V	14	3.4.4. Pruebas plasmáticas	30
1.1.3. Estructura del Factor V	15	3.5. Análisis Estadístico	33
1.1.4. Factor V Leiden	16	4. Resultados	34
1.1.5. Prevalencia del Factor V Leiden	17	4.1. Prevalencia del Factor V Leiden y de la Protrombina G20210A en la población estudiada	34
1.1.6. Importancia del Factor V Leiden	17	4.2. Prevalencia del Factor V Leiden y de la Protrombina G20210A en la población con diagnóstico de trombosis venosa o arterial.	36
1.2. Protrombina	18	4.3. Concordancia entre la determinación del polimorfismo FV Leiden y el test coagulométrico de Resistencia a la Proteína C Activada.	40
1.2.1. Gen que codifica a la Protrombina	18	4.4. Pruebas plasmáticas para el estudio de trombofilia: Proteína C, Proteína S libre, Antitrombina III.	42
1.2.2. Estructura de la Protrombina	19	4.4.1. Proteína C	43
1.2.3. Funciones de la Protrombina	19	4.4.2. Proteína S Libre	43
1.2.4. Polimorfismo G20210A	21	4.4.3. Antitrombina III	44
1.2.5. Prevalencia del polimorfismo G20210A	21	5. Discusión	44
1.2.6. Importancia del polimorfismo G20210A	21	6. Conclusión	48
1.3. Factor V Leiden y Protrombina G20210A en Argentina	22	7. Bibliografía:	50
2. Objetivo:	23	8. ANEXO I	53
3. Materiales y métodos:	23		

ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS FACTOR V LEIDEN Y PROTROMBINA G20210A EN PACIENTES ESTUDIADOS PARA TROMBOFILIA EN UN HOSPITAL PÚBLICO DE MENDOZA ARGENTINA.

Índice Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxinucleico

ACV: Accidente Cerebro Vascular

APTT: Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada

Arg: Arginina

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

Asn: Asparagina

COOH: grupo carboxilo

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfatos

dATP: Desoxiadenosin trifosfato

dCTP: Desoxicitosin trifosfato

dGTP: Desoxiguanosin trifosfato

dTTP: Desoxitimidin trifosfato

ET: Enfermedad Tromboembólica

fi: Frecuencia absoluta

Fi: Frecuencia absoluta acumulada

FIIa: Factor II activo

FVa: Factor V activo

FVIIIa: Factor VIII activo

FVL: Factor V Leiden, FV G1691A, FV R506Q (sustitución de Arginina por Gln en posición 506)

FV Cambridge (FV: R306T): sustitución de Arginina por Treonina en posición 306

FV Hong Kong (FV: R306G): sustitución de Arginina por Glicina en posición 306

Gln: Glutamina

hi: Frecuencia relativa simple

hi %: Frecuencia relativa porcentual
Hi %: Frecuencia porcentual acumulada
IAM: Infarto Agudo de Miocardio
Kb: kilobases
mM: Milimolar
Mr: Peso molecular relativo
MTHFR: Enzima Metilen Tetrahidro Folato Reductasa
MTHFR A1298C: Sustitución de Adenina por Citosina en codón 1298
MTHFR C677T: Sustitución de Citosina por Timina en codón 677 (variante termolábil)
NH₂: grupo amino
nt: Nucleótido
PAI 1: Inhibidor del activador del Plasminógeno 1
pb: Pares de bases
PCA: Proteína C Activada
PCR – RFLP: Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorshism
PT G20210A: Protrombina G20210A
RPCA: Resistencia a la Proteína C Activada
SAF: Síndrome Antifosfolipídico
SAH: Sociedad Argentina de Hematología
TAFI: Inhibidor de la Fibrinólisis activado por Trombina
TEP: Tromboembolismo Pulmonar
TVP: Trombosis Venosa Profunda
TVS: Trombosis Venosa Superficial
uM: Micromolar
ul: Microlitro
U/ul: Unidades por microlitro
Xa: Factor X activo

ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS FACTOR V LEIDEN Y PROTROMBINA G20210A EN PACIENTES ESTUDIADOS PARA TROMBOFILIA EN UN HOSPITAL PÚBLICO DE MENDOZA ARGENTINA.

Índice de Figuras

Figura 1: Estructura del gen que codifica al Factor V.....	14
Figura 2: Activación e inactivación del Factor V.....	16
Figura 3: Estructura del gen que codifica a la Protrombina.....	18
Figura 4: Activación de la Protrombina	20
Figura 5: Detección del Factor V Leiden.....	27
Figura 6: Detección de la Protrombina G20210A.....	30
Figura 7: Gráfico circular: Población incluida en el estudio.....	34
Figura 8: Gráfico de barras: Frecuencia porcentual del polimorfismo Factor V Leiden en la población estudiada.....	35
Figura 9: Gráfico de barras: Frecuencia porcentual del polimorfismo Protrombina G20210A en la población estudiada.....	36
Figura 10: Gráfico circular: Población con diagnóstico.....	38
Figura 11: Gráfico Box Plot del test de RPCA en genotipos GG y GA del FV Leiden.....	42

ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS FACTOR V LEIDEN Y PROTROMBINA G20210A EN PACIENTES ESTUDIADOS PARA TROMBOFILIA EN UN HOSPITAL PÚBLICO DE MENDOZA ARGENTINA.

Índice de tablas

Tabla 1: Análisis del polimorfismo FV Leiden en la población estudiada.....	35
Tabla 2: Análisis del polimorfismo Protrombina G20210A en la población estudiada.....	36
Tabla 3: Diagnóstico de los pacientes estudiados.....	37
Tabla 4: Polimorfismo del Factor V Leiden en la población con diagnóstico.....	38
Tabla 5: Análisis del polimorfismo Factor V Leiden en la población con diagnóstico de trombosis venosa o arterial.....	39
Tabla 6: Polimorfismo de la Protrombina G20210A en la población con diagnóstico.....	39
Tabla 7: Análisis del polimorfismo de la Protrombina en la población con diagnóstico de trombosis venosa o arterial.....	39
Tabla 8: Parámetros estadísticos del test de RPCA en pacientes con Genotipo GG para Factor V Leiden.....	41
Tabla 9: Parámetros estadísticos del test de RPCA en pacientes con Genotipo GA para Factor V Leiden.....	41
Tabla 10: Resultados de la aplicación de la Prueba T para muestras independientes.....	42
Tabla 11: Frecuencias de la determinación de la Proteína C.....	43
Tabla 12: Frecuencias de la determinación de la Proteína S Libre.....	43
Tabla 13: Frecuencias de la determinación de la Antitrombina III.....	44
Tabla 14: Prevalencia de los polimorfismos del FV Leiden y la PT G20210A en otros estudios...	46

ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS FACTOR V LEIDEN Y PROTROMBINA G20210A EN PACIENTES ESTUDIADOS PARA TROMBOFILIA EN UN HOSPITAL PÚBLICO DE MENDOZA ARGENTINA.

Resumen:

El término Trombofilia, se emplea para describir un desorden en el mecanismo hemostático que condiciona una predisposición para desencadenar un evento trombótico. Los polimorfismos más frecuentes asociados a trombofilia involucran a los genes que codifican el Factor V y Factor II de la coagulación, denominándose dichas variantes Factor V Leiden y Protrombina G20210A.

El objetivo de este estudio fue determinar y analizar la prevalencia de ambas variantes genéticas en una población de individuos estudiados para trombofilia en el Hospital Central de Mendoza. Este trabajo pretende proveer más literatura y datos de referencia en relación a la incidencia de estos polimorfismos entre individuos en Argentina.

Materiales y métodos: se analizaron 192 muestras sanguíneas de pacientes que concurren al Hospital Central para el estudio de trombofilia, mediante amplificación de material genético por la técnica PCR – RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism), y posterior tratamiento con enzimas de restricción.

Resultados: Para la determinación del Factor V Leiden, el 7,81 % de las muestras analizadas resultaron con un genotipo heterocigota GA, el 92,19 % con genotipo homocigota G, mientras que no se encontraron muestras con genotipo homocigota A. En cuanto a la determinación de la Protrombina G20210A, el 4,7 % de las muestras resultaron con un genotipo heterocigota GA, el 94,8 % con genotipo homocigota G, y el 0,5 % con genotipo homocigota A.

Conclusiones: la identificación de estos polimorfismos es importante ya que puede contribuir a la evaluación y manejo de pacientes con enfermedad tromboembólica.

Palabras claves: Trombofilia, Factor V Leiden, Protrombina G20210A, PCR – RFLP.

1. Introducción:

La enfermedad tromboembólica (ET) es la tercera causa de muerte cardiovascular después del infarto agudo de miocardio (IAM) y el accidente cerebro vascular (ACV), y se considera entre las principales causas de muerte intrahospitalaria. La trombosis venosa profunda (TVP) y el tromboembolismo pulmonar (TEP) conforman la ET (Grande Ratti *et al.*, 2018).

En Argentina se estima que más de sesenta mil personas sufren trombosis venosa por año, cuarenta y ocho mil TVP y quince mil TEP. La tasa de mortalidad del TEP es mayor al 30% lo cual se traduce en 4300 muertes por año (Ríos *et al.*, 2020).

La ET suele ser recurrente y si bien puede darse a cualquier edad, se acrecienta en personas afeadas debido a la presencia de múltiples comorbilidades. La ausencia de una causa que justifique la aparición de un evento trombótico conduce a la búsqueda de trombofilias o de una neoplasia oculta (Ubaldini *et al.*, 2016).

Debido a la importancia clínica de esta patología, se ha incrementado el interés de identificar a aquellos individuos más susceptibles a desarrollarla con el fin de adoptar medidas terapéuticas o profilácticas más adecuadas. Entre los factores de riesgo que pueden conducir a un estado de hipercoagulabilidad, se encuentra la trombofilia hereditaria, definida como una tendencia genéticamente determinada a desarrollar tromboembolismo venoso.

Dentro de las trombofilias hereditarias podemos nombrar aquellas debidas a alteraciones en los genes que codifican proteínas plasmáticas involucradas en mecanismos anticoagulantes naturales, como: déficits de Antitrombina (Egeberg *et al.*, 1965), Proteína C (Griffin *et al.*, 1981) y Proteína S (Comp *et al.*, 1984). Estas alteraciones, si bien están asociadas a un alto riesgo de trombosis, son muy poco frecuentes en la población. Presentan una incidencia menor al 0,2 % en el caso del déficit de Antitrombina, y menor al 0,5% en los déficits de Proteína C y Proteína S (Vargas Ruiz, 2019).

Otras alteraciones genéticas que producen trombofilias hereditarias involucran a los genes que codifican a las proteínas de coagulación: Factor V (FV) y Factor II (Protrombina).

También podemos nombrar a la variante termolábil de la Metilen Tetrahidro Folato Reductasa (MTHFR – C677T), enzima que actúa en el metabolismo de la homocisteína, como un polimorfismo genético frecuente en la población (Frosst *et al.*, 1995).

Anteriormente se creía que los polimorfismos de la MTHFR (C677T y A1298C) eran factores determinantes en el abordaje genético de la trombosis, pero estudios más recientes han desvirtuado dicha hipótesis y han demostrado que la existencia de altos niveles de homocisteína, no necesariamente ligada a estos polimorfismos, es la que se relaciona con la aparición de un primer evento de trombosis venosa (Hernandez *et al.*, 2014).

Los polimorfismos de la MTHFR, si bien en estudios individuales han mostrado tener alguna relación con patología trombótica, según la Guía de Diagnóstico y tratamiento de la Sociedad Argentina de Hematología (SAH), no hay suficiente evidencia que justifique incluirlos en el algoritmo diagnóstico de pacientes con sospecha de trombofilia (Altuna *et al.*, 2021).

1.1. Factor V

En 1993 Dahlback *et al.* describieron la resistencia a la proteína C activada (RPCA). Al realizar un ensayo in vitro con plasma de individuos con historia familiar de trombosis, observaron una pobre respuesta anticoagulante tras la adición de Proteína C Activada (PCA). El ensayo se basaba en la realización de la prueba de coagulación: Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT). La modificación de Dahlback consistía en calcular un cociente a partir de 2 APTT, obtenidos al realizar la prueba en presencia y ausencia de PCA. La PCA degrada proteolíticamente a los factores V y VIII activos (FVa, FVIIIa) de la coagulación, por lo tanto, al agregar un purificado de la misma, el tiempo debería alargarse; sin embargo, esto no ocurría.

En 1994 Bertina *et al.* publicaron su asociación con un defecto genético simple: la sustitución de una Guanina por una Adenina en el nucleótido 1691 del gen que codifica el FV de la coagulación (G1691A), el cual se localiza en el exón 10 de dicho gen en el cromosoma 1. Esta sustitución lleva a un cambio de una Arginina (Arg) por una Glutamina (Gln) en la posición 506 de la proteína, el cual es uno de los principales sitios de clivaje de la PCA. Esto conduce a un aumento en la resistencia a la acción proteolítica de dicha proteína y por lo tanto se ve disminuida la actividad anticoagulante de la misma. Este defecto genético fue denominado Factor V Leiden.

1.1.1. Gen que codifica al Factor V

El Factor V es codificado por un gen largo (aproximadamente 70 Kb), localizado en la región q21 – q25 del cromosoma 1. Presenta 25 exones y 24 intrones, además de los extremos 5' y 3' no traducidos. Los exones presentan tamaños variados: entre 72 – 2820 pares de bases (pb).



Figura 1: Estructura del gen que codifica al Factor V (Zabalegui, 2000).

1.1.2. Funciones del Factor V

Es una glicoproteína plasmática larga y asimétrica. Puede actuar como proteína procoagulante o anticoagulante según se requiera en las distintas situaciones hemostáticas (Beutler *et al.*, 2007).

Junto al Factor X, en presencia de calcio y en contacto con superficies de membrana, forma el complejo “Protrombinasa”, que actúa activando la Protrombina a Trombina.

En su forma no activada, potencia la actividad anticoagulante de la Proteína S, comportándose las dos proteínas como cofactores sinérgicos de la PCA en la degradación del Factor VIII.

Por lo tanto, juega un papel importante en la hemostasia, como encargado de mantener el delicado equilibrio anticoagulante y procoagulante de la sangre.

1.1.3. Estructura del Factor V

El Factor V circula en el plasma como una molécula inactiva (procofactor) de cadena simple, con un peso molecular (M_r) de aproximadamente 330.000 Dalton. El Factor X y la Trombina activan este procofactor a cofactor V activo (FVa).

El FVa está formado por una cadena pesada (M_r 110.000 Dalton) y una cadena ligera (M_r 73.000 Dalton). Estas cadenas se unen de manera no covalente por intermedio de iones metal (probablemente calcio). La cadena pesada mantiene el extremo NH₂ terminal del procofactor (residuos 1 – 709 y dominios A1 y A2). La cadena ligera tiene el extremo COOH terminal (residuos 1546 – 2196, dominios A3 – C1 – C2) (Beutler *et al.*, 2007).

El Factor V es inactivado por la acción proteolítica de la PCA a nivel de la cadena pesada. Se produce una proteólisis que rompe los enlaces a nivel de las Arg 506, Arg 306 y Arg 679. Se trata de un mecanismo ordenado y secuencial en el que la rotura a nivel de la Arg 506 es necesaria para una óptima exposición del resto de los aminoácidos diana. Esto genera fragmentos de 45.000, 30.000, y 22/20.000 Dalton (Beutler *et al.*, 2007).

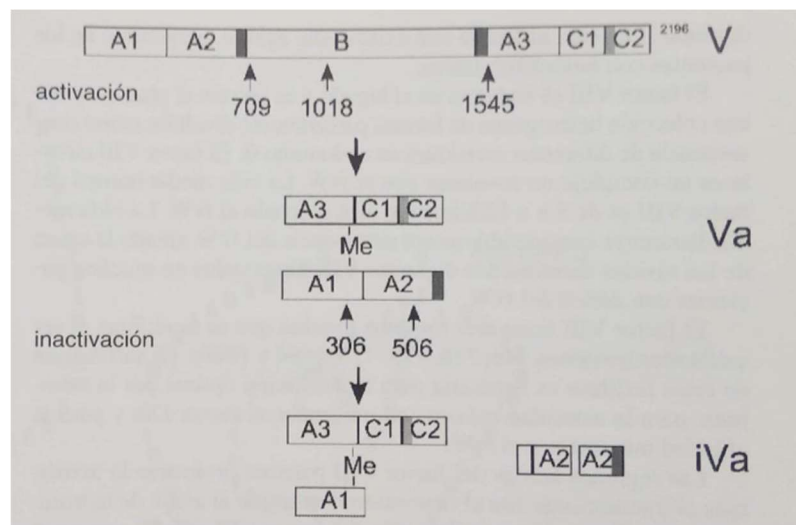


Figura 2: Activación e inactivación del Factor V (Beutler *et al.*, 2007)

1.1.4. Factor V Leiden

Este polimorfismo de nucleótido simple consiste en una sustitución de una Guanina por una Adenina en la posición 1691 del gen que codifica el factor V. Este cambio se produce en el exón 10, que está constituido por 215 nucleótidos (Bertina *et al.*, 1994).

El aminoácido 506 de la proteína normal es la Arginina, la cual es codificada por el triplete CGA. En presencia de dicha sustitución, el triplete CAA resultante, codifica una Glutamina en esa posición. La PCA no reconoce el sitio de corte en posición 506 por lo que sigue buscando las siguientes dianas (Arg 306 y Arg 679). Esto se traduce en un enlentecimiento en la velocidad de inactivación del FVa en estas condiciones, en comparación con el FVa normal (Bertina *et al.*, 1994).

Esta deficiente inactivación del FVa tiene como consecuencia:

- Mayor formación de trombina, reflejada por niveles elevados de fragmentos 1+2 de la protrombina y por complejos Trombina – Antitrombina en pacientes resistentes a la PCA.
- Pérdida de la eficacia como cofactor de la PCA en la degradación del FVIII.

- Mayor activación del Inhibidor de la Fibrinólisis Activado por Trombina (TAFI), como respuesta a la elevada producción de trombina.

1.1.5. Prevalencia del Factor V Leiden

Su prevalencia en la población general varía en función del grupo étnico y del área geográfica considerados. Hay razas en las que este polimorfismo no está presente o se encuentra en muy baja frecuencia (menor al 1%), como las poblaciones africanas, asiática y nativa americana. En la raza caucásica oscila entre un 2 – 7% (Noroña Calvachi, 2015).

En pacientes con un primer evento trombotico la prevalencia oscila entre un 12 – 20% y en la población con trombosis recurrente puede llegar hasta un 80% (Noroña Calvachi, 2015).

1.1.6. Importancia del Factor V Leiden

El polimorfismo del FV Leiden parece ser el defecto genético asociado a ET más prevalente descrito hasta el momento. Explica más del 90% de los casos de resistencia a la PCA.

Si no se encontrara asociado a otros defectos genéticos o factores de riesgo circunstanciales, los eventos tromboticos podrían no presentarse hasta una edad avanzada, o quizás nunca.

El riesgo de trombosis para individuos heterocigotas es de 3 a 7 veces mayor y para homocigotas asciende hasta 20 veces. En ciertas situaciones como cirugía, traumatismos o embarazo este riesgo se multiplica por 7, en terapia hormonal sustitutiva se multiplica por 15 y se eleva hasta 35 en pacientes en tratamiento con anticonceptivos orales (Sierra Aisa *et al.*, 2016).

Los eventos trombóticos se producen generalmente en territorio venoso, afectando a las extremidades inferiores, pero también se ha descrito algún evento trombótico aislado en territorio arterial en forma de infarto cardíaco o ictus (Beutler *et al.*, 2007).

La presencia de la mutación homocigota se asocia con aparición de trombosis en individuos más jóvenes y con mayor tasa de recurrencia.

Se han encontrado otras mutaciones a nivel del FV que producen variantes de este polimorfismo, el FV de Hong Kong (FV: R306G) y el FV de Cambridge (FV: R306T). Éstas, están asociadas a menor riesgo trombótico que el FV Leiden (Sierra Aisa *et al.*, 2016).

1.2. Protrombina

La Protrombina es un precursor de la Trombina, la cual induce la formación de Fibrina. En 1996 Poort *et al.*, publicaron un polimorfismo en la región 3' no traducida del gen de la protrombina, en el nucleótido 20210. Se produce un cambio de una Guanina por una Adenina (G20210A). Si bien esto no altera la composición de la proteína, da lugar a un aumento en la síntesis de protrombina, pudiendo producir niveles más elevados en plasma, especialmente en genotipos homocigotas; lo cual puede predisponer a la trombosis.

1.2.1. Gen que codifica a la Protrombina

La Protrombina es codificada por un gen localizado en el cromosoma 11, compuesto por 14 exones separados por 13 intrones. La región que flanquea al extremo 5' del gen, contiene la región promotora y dos o más secuencias de acción, que son porciones de ADN que actúan como promotores, potenciadores o silenciadores. El ARNm al que da lugar, tiene 2.1 Kb e incluye una región 5' no traducida, una secuencia de lectura y una región 3' no traducida de 97 pb.



Figura 3: Estructura del gen que codifica a la Protrombina (Zabalegui, 2000).

1.2.2. Estructura de la Protrombina

Es una glicoproteína plasmática sintetizada principalmente en el hígado. Circula como un zimógeno de cadena única con un M_r de aproximadamente 72.000 Dalton y presenta una vida media de 60 horas. Es una proteína vitamina K dependiente, por lo que necesita de ésta para ejercer su acción adecuadamente (Beutler *et al.*, 2007).

Estructuralmente puede ser dividida en 2 partes: la mitad amino terminal denominada fragmento 1,2 (F1+2), contiene 273 aminoácidos y dos cadenas de oligosacáridos unidas a los residuos Asparagina (Asn) 78 y 100. Este fragmento presenta dos estructuras en forma de lazo o kringle. Los dominios kringle son estructuras mantenidas por tres puentes disulfuro. La función principal de estos dominios parece ser la unión a otras proteínas, como activadores, sustratos, cofactores o receptores. La otra mitad, que corresponde al extremo carboxiterminal, es la precursora de la trombina (pretrombina). Contiene unos 306 aminoácidos y una cadena oligosacárida en un residuo Asn con un M_r de 36.600 Dalton (Beutler *et al.*, 2007).

1.2.3. Funciones de la Protrombina

La protrombina es un zimógeno inactivo, que para tener actividad debe ser dividido por el complejo Protrombinasa (Xa/Va) en dos sitios (Arg 271 y Arg 320). De esta manera el complejo catalítico, Trombina (FIIa), es liberado del resto de la molécula (F1+2).

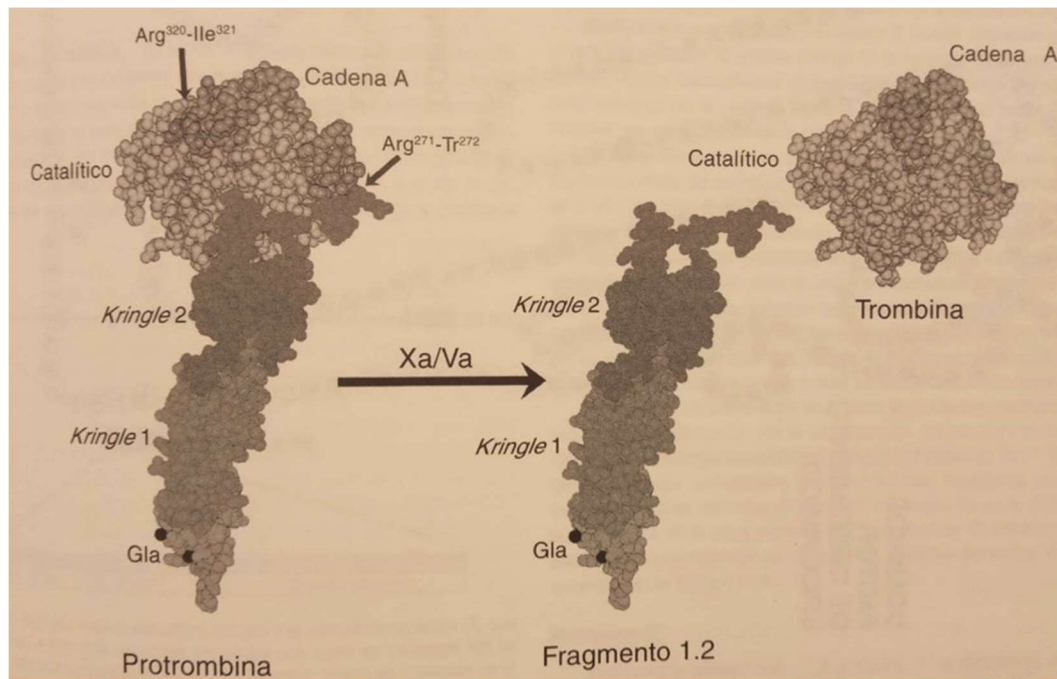


Figura 4: Activación de la Protrombina (Beutler *et al.*, 2007)

La Trombina presenta complejas funciones en los sistemas coagulante, anticoagulante y fibrinolítico.

- Actividad coagulante: transforma el fibrinógeno a fibrina, participa en círculos de retroalimentación positiva mediante la activación de las plaquetas y de los factores de la coagulación V, VIII, XI y XIII.
- Actividad anticoagulante: al unirse a la Trombomodulina, interviene en la activación de la Proteína C, la cual inhibe la acción coagulante de los Factores Va y VIIIa.
- Actividad Fibrinolítica: forma complejos con el Inhibidor del Activador del Plasminógeno (PAI – 1).
- Actividad antifibrinolítica: activa el TAFI (Inhibidor de la fibrinólisis activado por Trombina).

1.2.4. Polimorfismo G20210A

Consiste en el cambio de una Guanina por una Adenina en el nucleótido 20210 del gen que codifica la protrombina. Esta sustitución se localiza en la región 3' no traducida, por lo tanto, la proteína a la que da lugar, es estructural y funcionalmente igual que la proteína originada por el gen normal (Poort *et al.*, 1996)

En 1996 Poort *et al.*, comprobaron que este polimorfismo parecía estar más presente en pacientes con ET. Observaron diferencias significativas en los niveles de protrombina plasmática entre pacientes con genotipo normal (GG) y pacientes con genotipo heterocigota (GA).

El mecanismo por el cual se produce este incremento en los niveles de protrombina, no está del todo claro, pero se cree que este polimorfismo podría suponer una mayor eficiencia en la transcripción o una mayor estabilidad del ARN mensajero (ARNm) transcripto.

1.2.5. Prevalencia del polimorfismo G20210A

Al igual que el FV Leiden, su prevalencia varía en función del grupo étnico y el área geográfica considerados. Es poco común en afroamericanos (0,5 %), asiáticos, y nativos africanos y americanos. En la población caucásica se encuentra en el 2 – 4 % de la población general (Vargas Ruiz, 2019).

1.2.6. Importancia del polimorfismo G20210A

Este polimorfismo se hereda en forma autosómica dominante y es la segunda alteración más frecuente encontrada en individuos con ET. El riesgo relativo de padecer una trombosis venosa en portadores es 3 – 4 veces mayor que en no portadores. En homocigotas el riesgo es 10 – 20 veces mayor (Sierra Aisa *et al.*, 2016).

Es considerada una trombofilia de bajo riesgo, que expone fundamentalmente a trombosis venosa profunda, trombosis portal y trombosis venosa cerebral.

Su importancia en trombosis arterial no es suficientemente clara, algunos estudios sugieren que podría asociarse a un riesgo incrementado de IAM en pacientes fumadores jóvenes.

1.3. Factor V Leiden y Protrombina G20210A en Argentina

Según la Guía de Diagnóstico y tratamiento de la Sociedad Argentina de Hematología (SAH) (Altuna *et al.*, 2021), se considera de importancia la búsqueda de estos polimorfismos en:

- ✚ Pacientes que han tenido un evento trombótico antes de los 50 años:
 - Espontáneo o desproporcionado al factor desencadenante.
 - Que ocurre bajo trombopprofilaxis adecuada.
 - Con fuerte historia familiar.
 - Asociado a estrogenoterapia o embarazo / puerperio.
- ✚ Pacientes con trombosis venosa esplácica en ausencia de factores locales.
- ✚ Pacientes con trombosis de senos cerebrales en ausencia de factores loco – regionales.
- ✚ Pacientes con TVP de miembro superior, y/o cuello, antes de los 50 años, no asociada a catéter o compresión.
- ✚ Necrosis cutánea asociada al uso de antagonistas de vitamina K.
- ✚ Niños y adolescentes con trombosis espontáneas o recurrentes.
- ✚ Pacientes asintomáticos con historia familiar de trombofilia.

Estudios realizados en nuestro país revelan que en la población general el 2,9 % de los individuos son heterocigotas para el polimorfismo FV Leiden y el 2,6 % para el polimorfismo Protrombina G20210A (Genoud *et al.*, 2000). En pacientes que han sufrido un primer evento trombótico, la prevalencia reportada ha sido de 10 % para FV Leiden y 6,3 % para Protrombina G20210A (Iglesias Varela *et al.*, 2001).

Tanto el FV Leiden como la Protrombina G20210A son los polimorfismos más frecuentemente hallados en trombofilias hereditarias. Si bien son considerados factores trombofílicos de bajo riesgo, su presencia en conjunto con otros factores adquiridos, podrían aumentar el riesgo de ET.

2. Objetivo:

Determinar la prevalencia total de los polimorfismos Factor V Leiden y Protrombina G20210A en una población de individuos a los que se les solicitaron pruebas de trombofilia en el Hospital Central de Mendoza.

Determinar la prevalencia de los polimorfismos Factor V Leiden y Protrombina G20210A en pacientes con diagnóstico de trombosis venosa o arterial.

Evaluar la concordancia entre la determinación molecular del FV Leiden y el test coagulométrico de Resistencia a la Proteína C Activada (RPCA).

Detectar alteraciones en pruebas plasmáticas para el estudio de trombofilia en pacientes que presenten alguno de los polimorfismos estudiados en este trabajo.

3. Materiales y métodos:

3.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo descriptivo, retrospectivo, transversal; el cual se llevó a cabo en las instalaciones del Hospital Central de Mendoza, en el Servicio de Bioquímica Clínica, secciones de Hematología y Biología Molecular.

3.2. Población estudiada

Se analizaron muestras sanguíneas de 192 pacientes (122 mujeres y 70 hombres) que concurrieron al Hospital Central de Mendoza entre 2017 y 2021, a los cuales se les había solicitado estudios de biología molecular para determinar la presencia de FV Leiden y Protrombina G20210A. El promedio de edad de dichos pacientes fue de 39 años (edades comprendidas entre 15 y 77 años).

3.3. Criterios de inclusión y exclusión

Para la determinación de la prevalencia de los polimorfismos FV Leiden y Protrombina G20210A se incluyeron los resultados correspondientes a todos los individuos de la población estudiada.

Para la determinación de la prevalencia de los polimorfismos FV Leiden y Protrombina G20210A en pacientes con diagnóstico de trombosis venosa o arterial, solamente se incluyeron los resultados correspondientes a los individuos de la población estudiada cuyo diagnóstico de trombosis venosa o arterial figuraba escrito en su pedido médico o historia clínica. Se excluyeron aquellos individuos de los que no se pudo saber su diagnóstico o que no presentaron específicamente un diagnóstico de trombosis, y aquellos que se estudiaron solo por presentar antecedentes familiares.

3.4. Procedimiento

3.4.1. Obtención de las muestras

De cada individuo se tomó una muestra de sangre entera en tubos comerciales al vacío de 4 ml totales BD Vacutainer® con anticoagulante EDTA dipotásico (7,2 mg). El ADN fue extraído de las células sanguíneas de la serie blanca, para lo cual se realizó la separación de las mismas (buffy coat) utilizando un medio en gradiente de densidad (Ficoll Hypaque, densidad: 1,077 g/ml). El buffy coat obtenido fue resuspendido en buffer

fosfato salino (PBS), y fue conservado en freezer a – 20°C hasta ser usado para la extracción de ADN (Austin *et al.*, 1996).

3.4.2. Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN a partir del buffy coat obtenido, usando una técnica de extracción con sales de guanidina y etanol (kits DNAzol®, Nucleospin Blood®). El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del kit utilizado.

3.4.3. Análisis genético

Las muestras de ADN fueron analizadas mediante PCR – RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism). La amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica muy sensible, descrita por Kary Mullis en 1986, que se basa en la obtención de gran número de copias de una secuencia específica de ADN por replicación enzimática, gracias a la repetición cíclica de tres reacciones simples (desnaturalización, hibridación, y extensión), cuyas condiciones solo varían en la temperatura y tiempo de incubación.

Se amplificaron las regiones genéticas dentro de las cuales pueden encontrarse o no los polimorfismos buscados, de esta manera se obtuvo una cantidad de ADN lo suficientemente alta para ser detectada por electroforesis en gel de agarosa.

Para la detección de los polimorfismos se utilizaron enzimas de restricción cuyo punto de corte en la secuencia estudiada deja en evidencia un patrón de bandas distinto en el caso de un individuo portador o no portador de dichas variantes.

3.4.3.1. Detección de Factor V Leiden

Para determinar FV Leiden se utilizaron primers (cebadores) wild type descritos por Bertina *et al.*

PRIMER FORWARD	5'- TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA – 3' (nt 1581 – 1602)
PRIMER REVERSE	5'- TGTTATCACACTGGTGCTAA – 3' (nt 127 – 146 del intrón 10)

Condiciones de la PCR:

Buffer de reacción (Mint 5x Inbio Highway®)	5 ul
Agua libre de nucleasas	2,25 ul
Cloruro de Magnesio (25 mM)	5 ul
Desoxinucleotidos trifosfato (dNTPs) (5mM)	1,5 ul de cada uno (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
Primer Forward (20 uM)	0,625 ul
Primer Reverse (20 uM)	0,625 ul
Taq Polimerasa Inbio Highway® (5 U/ul)	0,5 ul
ADN a estudiar (40 – 60 ng/ul)	5 ul

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un volumen final de 25 ul. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador “My Gene Series Peltier Thermal Cycler”, modelo MG 96 G/Y (Long Gene ®), con un programa de ciclado de 38 ciclos (94°C 20 segundos, 60 °C 20 segundos, 72°C 20 segundos) con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C (Bertina *et al.*, 1994).

Se amplificó un fragmento de 267 pares de bases.

Las muestras amplificadas se sometieron a un proceso de digestión con la enzima de restricción Mnl I (10 U/ul Thermo Scientific®) que reconoce los sitios de restricción CCTC y actúa a 37 °C. Los volúmenes utilizados fueron: 13 – 15 ul de las muestras amplificadas y 1 ul de la enzima de restricción Mnl I, que fueron incubados a 37 °C overnight. Los productos de la restricción se corrieron en un gel de agarosa al 3% p/v, a un voltaje de 130 Volts, por 25 minutos. Para observar el resultado de la acción de la enzima de restricción y determinar la presencia de la variante genética, el gel de agarosa fue teñido con un colorante de ácidos nucleicos (DS View Nucleic, Dongshen Biotech ®, Bromuro de Etidio) en una proporción de 1 – 3 ul del colorante de ácidos nucleicos por cada 40 ml de gel de agarosa. Se realizó la observación del mismo a través de un transiluminador ultravioleta (UV) (Bertina *et al.*, 1994).

La enzima de restricción Mnl I reconoce dos sitios de corte en el FV normal, generando tres fragmentos: 163 pb, 67 pb, 37 pb.

La presencia de la variante genética FV Leiden, elimina un sitio de restricción por lo tanto la acción de la enzima genera 2 fragmentos: 200 pb, 67 pb.

Mediante la observación del patrón de bandas obtenidos en el gel podemos distinguir tres genotipos:

- ✓ Homocigota Normal G/G: 163 pb, 67 pb, 37 pb.
- ✓ Homocigota Mutado A/A: 200 pb, 67 pb.
- ✓ Heterocigota G/A: 200 pb, 163 pb, 67 pb, 37 pb.

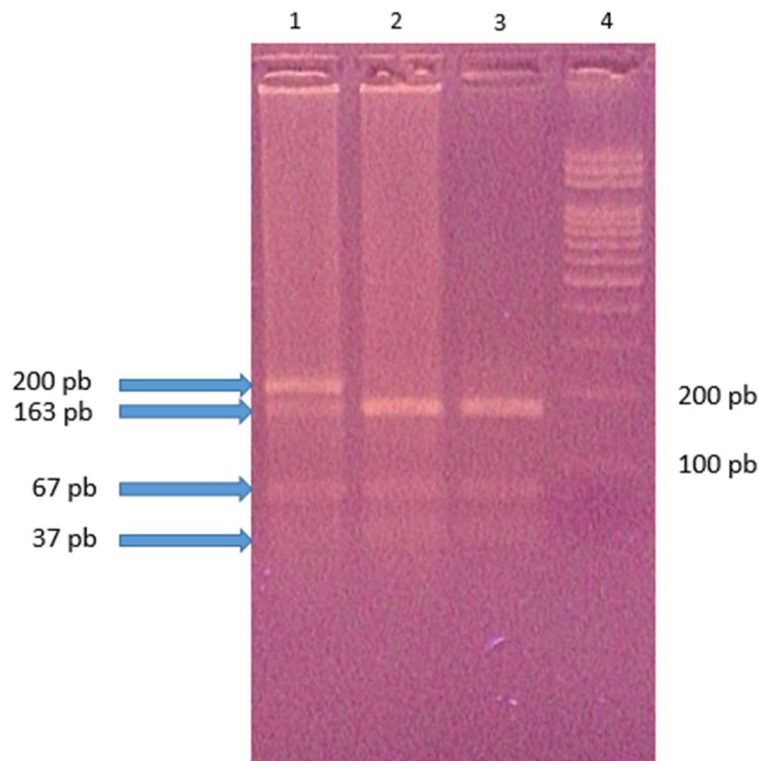


Figura 5: Detección de FV Leiden. Productos de la restricción con enzima Mnl I corridos en gel de agarosa al 3% p/v teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Paciente heterocigota G/A para el polimorfismo FV Leiden. Carriles 2 y 3: Pacientes homocigotas G/G normales. Carril 4: Marcador de peso molecular.

3.4.3.2. Detección de la Protrombina G20210A

Para detectar la Protrombina G20210A se utilizaron primers descritos por Poort *et al.*:

PRIMER FORWARD	5'- TCTAGAAACAGTTGCCTGGC – 3' (nt 19889 – 19908)
PRIMER REVERSE (mutado)	5'- ATAGCACTGGGAGCATTGAA*GC – 3' (nt 20233 – 20212) (*) Sustitución nucleotídica

Condiciones de la PCR:

Buffer de reacción (Mint 5x Inbio Highway®)	5 ul
Agua libre de nucleasas	7,25 ul
Cloruro de Magnesio (25 mM)	1,5 ul
Desoxinucleotidos trifosfato (dNTPs) (5 mM)	1,25 ul de cada uno (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
Primer Forward (20 uM)	0,375 ul
Primer Reverse (20 uM)	0,375 ul
Taq Polimerasa Inbio Highway® (5 U/ul)	0,5 ul
ADN a estudiar (40 – 60 ng/ul)	5 ul

Al igual que para el FV Leiden, la reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un volumen final de 25 ul. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador “My Gene Series Peltier Thermal Cycler”, modelo MG 96 G/Y (Long Gene ®), con un programa de ciclado de 38 ciclos (94°C 20 segundos, 60 °C 20 segundos, 72°C 20 segundos) con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C (Poort *et al.*, 1996).

Se amplificó un fragmento de 345 pb.

Las muestras amplificadas se sometieron a un proceso de digestión con la enzima de restricción Hind III (10 U/ul Thermo Scientific®), que reconoce los sitios de restricción AAGCTT y actúa a 37°C. Los volúmenes utilizados fueron 13 – 15 ul de las muestras amplificadas y 1 ul de la enzima de restricción Hind III, que fueron incubados a 37°C overnight. Los productos de la restricción se corrieron en un gel de agarosa al 3% p/v, a un voltaje de 130 Volts, por 35 - 40 minutos. Para observar el resultado de la acción de

la enzima de restricción y determinar la presencia de la variante genética, el gel de agarosa fue teñido con un colorante de ácidos nucleicos (DS View Nucleic, Dongshen Biotech ®, Bromuro de Etidio) en una proporción de 1 – 3 ul del colorante de ácidos nucleicos por cada 40 ml de gel de agarosa. Posteriormente fueron visualizados en un transiluminador UV (Poort *et al.*, 1996).

La enzima de restricción Hind III, solo reconoce un sitio de restricción en la secuencia que presenta el polimorfismo G20210A. El punto de corte es generado por la combinación del polimorfismo y la sustitución presente en el primer reverse. Por lo tanto, en ausencia del mismo, no reconocerá ningún sitio de corte quedando el fragmento de 345 pb amplificado intacto. En presencia del polimorfismo se producen dos fragmentos, de 322 pb y 23 pb.

Mediante la observación del patrón de bandas obtenidos en el gel, podemos distinguir tres genotipos:

- ✓ Homocigota Normal G/G: 345 pb.
- ✓ Homocigota Mutado A/A: 322 pb, 23 pb.
- ✓ Heterocigota G/A: 345 pb, 322 pb, 23 pb.

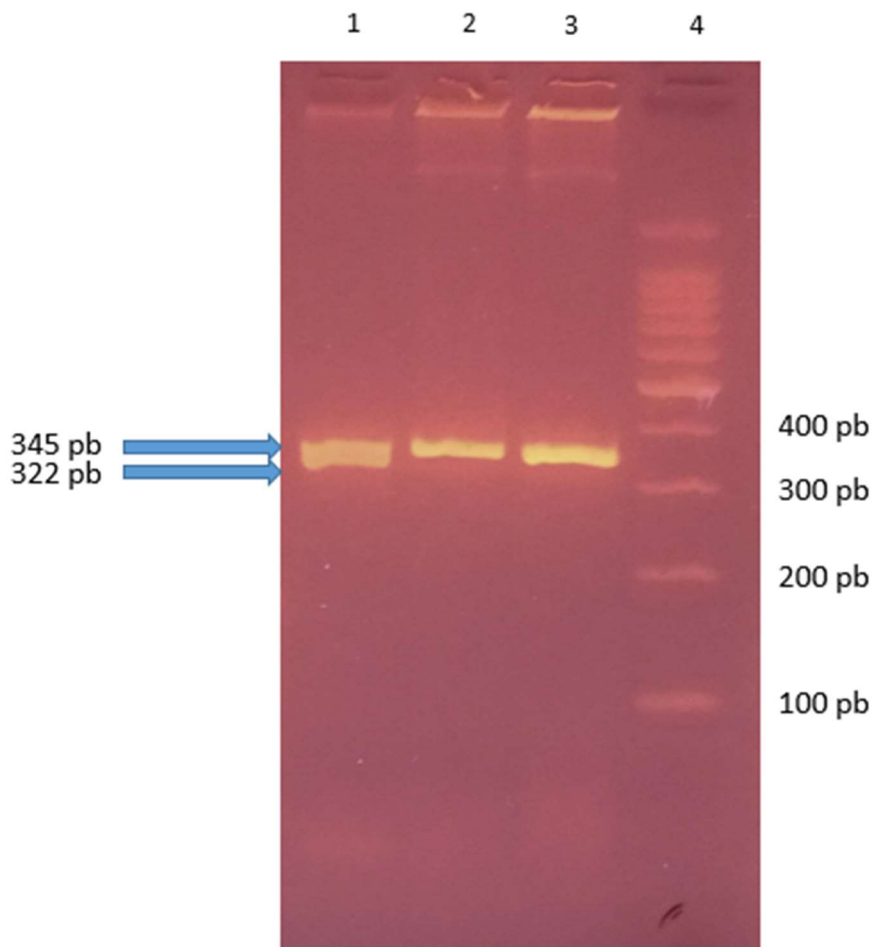


Figura 6: Detección de la Protrombina G20210A: Productos de la restricción con enzima Hind III corridos en gel de agarosa al 3% p/v teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Paciente heterocigota G/A para el polimorfismo Protrombina G20210A. Carriles 2 y 3: Pacientes homocigotas G/G normales. Carril 4: Marcador de peso molecular.

3.4.4. Pruebas plasmáticas

Se recopilaron los resultados correspondientes a pruebas plasmáticas para el estudio de trombofilia hereditaria. Estos estudios fueron realizados según lo solicitado en el pedido médico a la población estudiada. Las pruebas consideradas fueron:

- Test de resistencia a la proteína C activada (RPCA).
- Determinación de Antitrombina.

- Determinación de Proteína S libre.
- Determinación de Proteína C.

3.4.4.1. Obtención de las muestras

Para estas pruebas se tomaron muestras sanguíneas en tubos comerciales al vacío BD Vacutainer® con anticoagulante citrato de sodio al 3,2% p/v (0,109 M). Las muestras fueron procesadas en un coagulómetro automático ACL TOP 300, con reactivos de marca HemoSIL®.

3.4.4.2. Fundamentos de las técnicas plasmáticas

3.4.4.2.1. Test de resistencia a la proteína C activada (RPCA)

El plasma de la muestra es prediluido con plasma reactivo factor V e incubado con el reactivo APTT por un periodo estándar de tiempo. La coagulación es desencadenada por la adición de cloruro de calcio (CaCl_2) en ausencia y presencia de PCA, registrándose el tiempo de formación del coágulo.

La predilución con plasma reactivo factor V (plasma deficiente en factor V), permite la normalización de las concentraciones de otras proteínas del plasma que actúan en la formación y regulación de la trombina; por lo que aumenta la sensibilidad y especificidad de la prueba significativamente en relación con la presencia del polimorfismo FV Leiden.

Los resultados se expresan en segundos y ratio:

$$\text{Ratio} = \frac{\text{APTT (PCA/CaCl}_2\text{)}}{\text{APTT(CaCl}_2\text{)}}$$

El valor de corte establecido en nuestro laboratorio es de 2,2. Los resultados obtenidos de esta determinación fueron evaluados en conjunto con los resultados obtenidos de la determinación molecular del FV Leiden.

3.4.4.2.2. Antitrombina

La detección de la antitrombina se realiza en plasma mediante un método cromogénico. Consiste en la incubación de la muestra con un reactivo FXa, en presencia de un exceso de heparina. Luego se cuantifica la actividad del FXa residual con un sustrato cromogénico sintético que contiene paranitroanilina. La paranitroanilina liberada es medida cinéticamente a 405 nmómetros, siendo su nivel inversamente proporcional a la actividad de la antitrombina de la muestra. Los resultados se expresan en porcentaje (%) de actividad, siendo 80 a 130 % los valores de referencia establecidos en nuestro laboratorio.

3.4.4.2.3. Proteína S libre

La determinación se realiza por turbidimetría de partículas de látex. El método utiliza dos reactivos: una suspensión de partículas de látex de poliestireno a la cual se le ha unido la proteína transportadora de la fracción C4b del complemento (C4BP) y una suspensión de partículas de látex de poliestireno a las que se les ha unido un anticuerpo monoclonal específico contra la Proteína S humana.

La C4BP adsorbida sobre el primer reactivo de látex reacciona con una alta afinidad con la Proteína S libre del plasma del paciente, en presencia de iones calcio. La Proteína S libre unida a la C4BP del látex, provoca la aglutinación del segundo reactivo de látex. El grado de aglutinación será directamente proporcional a la concentración de Proteína S libre en el plasma.

Los resultados de Proteína S libre, se informan en porcentaje (%) de normalidad. Los valores de referencia establecidos en nuestro laboratorio son: para mujer, 55 a 124 %; y para hombre, 74 a 146 %.

3.4.4.2.4. Proteína C

La detección de proteína C se realiza mediante un método cromogénico. El ensayo consiste en una incubación del plasma problema con el activador de la proteína C (fracción proteica derivada del veneno de la serpiente *Agkistrodon contortrix contortrix*); luego se realiza la cuantificación de la proteína C activada usando un sustrato cromogénico sintético que contiene paranitroanilina. La paranitroanilina liberada se mide cinéticamente a 405 nanómetros, siendo su nivel directamente proporcional a la actividad de la proteína C de la muestra.

Los valores de proteína C se informan en porcentaje (%) de actividad. Los valores de referencia establecidos en nuestro laboratorio son de 70 a 140 %.

3.5. Análisis Estadístico

Los datos de la población estudiada fueron registrados en una hoja de cálculo Excel (Anexo I) y fueron analizados mediante estadística descriptiva utilizando el programa SPSS Versión 25.

Se tomaron en cuenta los siguientes datos: sexo, edad, resultados de la detección molecular de FV Leiden y PT G20210A, los cuales fueron registrados como genotipo GG (normal), genotipo GA (heterocigota mutado), genotipo AA (homocigota mutado).

También se registraron los datos correspondientes a pruebas plasmáticas realizadas a esos pacientes en el caso de que hayan sido solicitadas en el pedido médico. Las pruebas que se tomaron en cuenta fueron: Test de resistencia a la Proteína C Activada (RPCA), Proteína S Libre, Proteína C, Antitrombina III. De estas pruebas el test de RPCA fue consignado con su valor numérico, mientras que las demás determinaciones se registraron como normal, bajo o aumentado según el resultado obtenido.

4. Resultados

4.1. Prevalencia del Factor V Leiden y de la Protrombina G20210A en la población estudiada

Como se ha mencionado anteriormente se analizó una población de 192 individuos, con un promedio de edad de 39 años, a los cuales se les habían solicitado estudios de trombofilia hereditaria: Factor V Leiden y Protrombina G20210A.

De los individuos que formaron parte de la muestra analizada, el 64% (122) fueron mujeres y el 36% (70) fueron hombres.

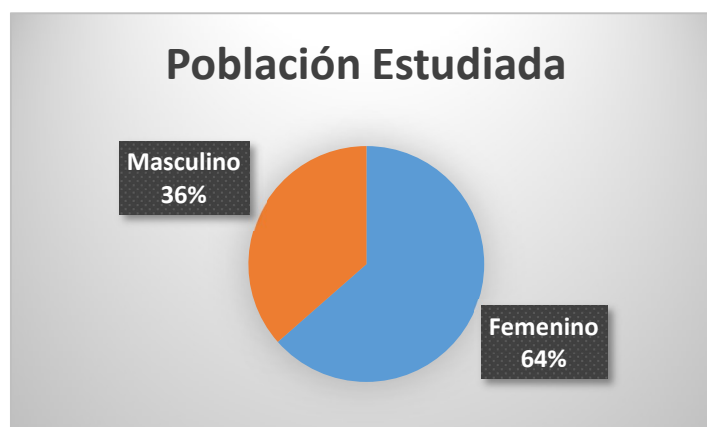


Figura 7: Gráfico de la población incluida en el estudio.

Para la determinación del FV Leiden, el 92,19 % (177) resultaron con un genotipo homocigota GG, es decir, con genotipo normal, que no presenta el polimorfismo. El 7,81 % (15) tuvieron un genotipo heterocigota GA, y no se encontraron pacientes con genotipo homocigota AA (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis del polimorfismo Factor V Leiden en la población estudiada.

Genotipos FVL	fi	Fi	hi	hi %	Hi %
GA	15	15	0.078	7.81	7.81
GG	177	192	0.922	92.19	100.0
Total	192		1.000	100	

fi: frecuencia absoluta, Fi: frecuencia absoluta acumulada, hi: frecuencia relativa simple, hi %: frecuencia relativa porcentual, Hi %: Frecuencia porcentual acumulada.

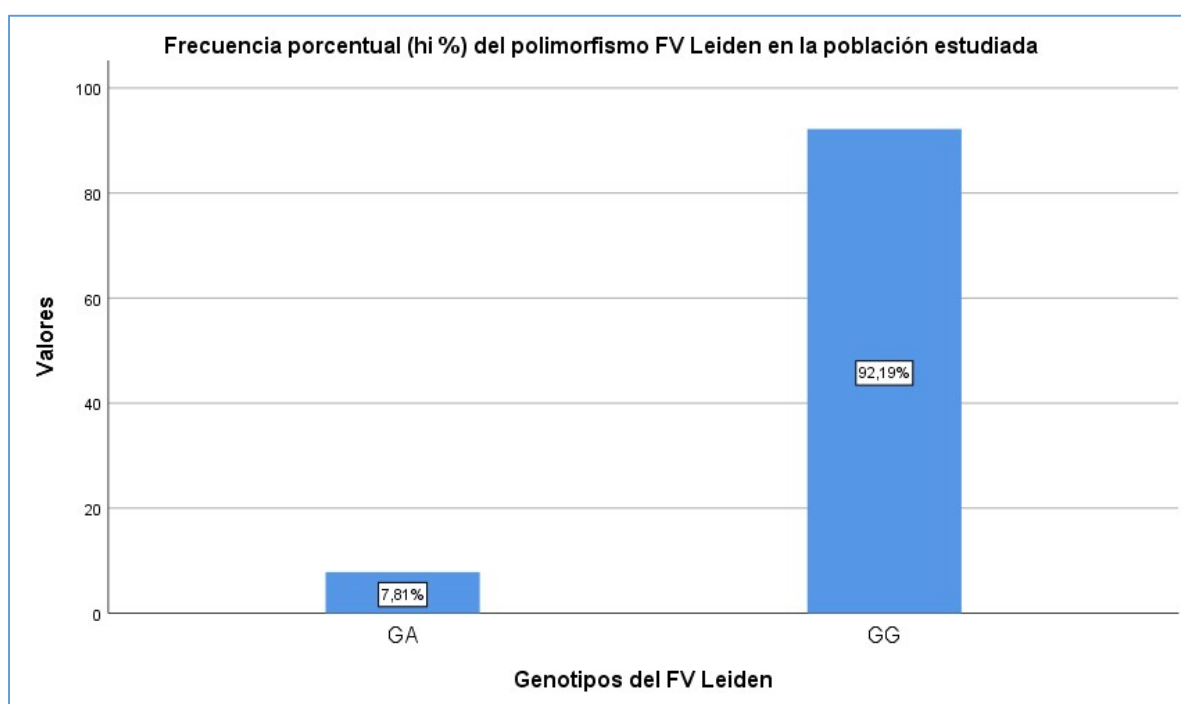


Figura 8: Gráfico de barras de la frecuencia porcentual del polimorfismo FV Leiden en la población estudiada.

En la determinación de la PT G20210A, el 94,79 % (182) resultaron con un genotipo homocigota GG, es decir, no presentaron el polimorfismo. El 4,69 % (9) tuvieron un genotipo heterocigota GA, y el 0,52 % (1) con genotipo homocigota AA (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis del polimorfismo Protrombina G20210A en la población estudiada.

Genotipos PT G20210A	fi	Fi	hi	hi %	Hi %
AA	1	1	0,005	0,52	0,5
GA	9	10	0,047	4,69	5,2
GG	182	192	0,948	94,79	100,0
Total	192		1,000	100,0	

fi: frecuencia absoluta, Fi: frecuencia absoluta acumulada, hi: frecuencia relativa simple, hi %: frecuencia relativa porcentual, Hi %: Frecuencia porcentual acumulada.

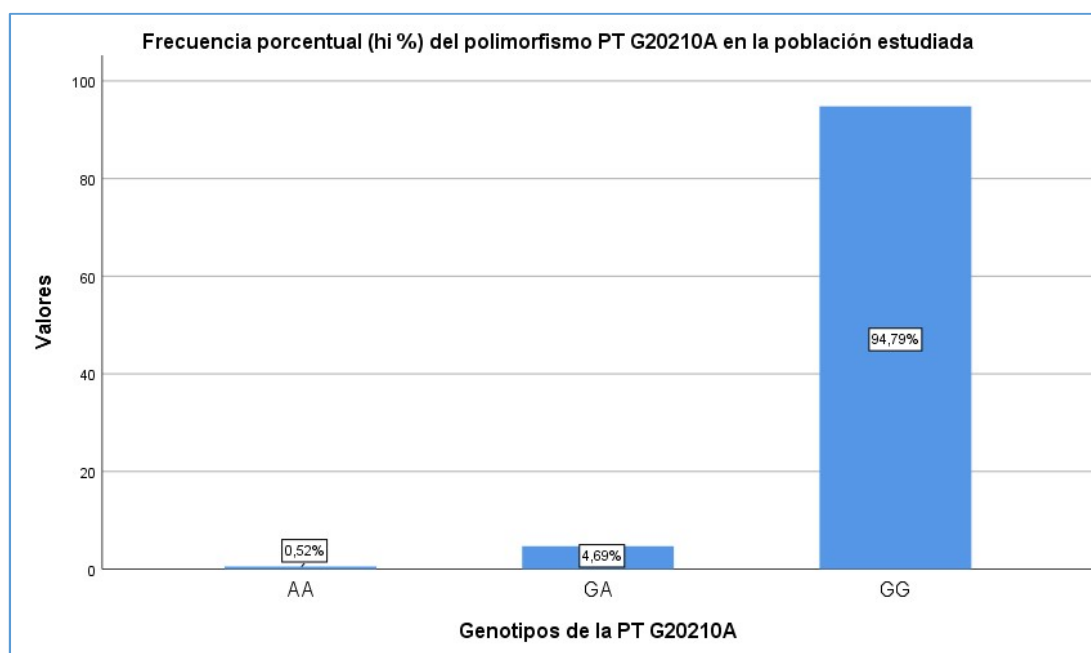


Figura 9: Gráfico de barras de la frecuencia porcentual del polimorfismo de la Protrombina G20210A en la población estudiada.

4.2. Prevalencia del Factor V Leiden y de la Protrombina G20210A en la población con diagnóstico de trombosis venosa o arterial.

De los 192 individuos que formaron parte de la muestra, solo el 35,4 % (68) tenían datos acerca del diagnóstico en la historia clínica y/o en la orden médica, que motivó el pedido de estudio de trombofilia.

De la población de individuos que presentaron diagnóstico, los más frecuentes fueron TVP 42,6 % (29/68), TEP 11,8 % (8/68), abortos recurrentes 10,3 % (7/68) (Figura 10).

Algunos individuos presentaron más de una patología diagnosticada: TEP y TVP 5,9 % (4/68); TVP y trombosis venosa superficial (TVS) 1,5 % (1/68), TVP y síndrome anti fosfolipídico (SAF) 1,5 % (1/68); ACV y cardiopatía 1,5 % (1/68); y TVP, TEP, y trombosis arterial 1,5 % (1/68) (Tabla 3).

Del total de individuos con diagnóstico, el 75 % (51/68) presentaron trombosis venosa o arterial, incluyendo en esta categoría los diagnósticos TVP, TVS, TEP, Trombosis Cerebral, y Trombosis Arterial. De estos pacientes, presentaron genotipo homocigota normal (GG) 92,16 % (47/51) y genotipo heterocigota GA 7,84 % (4/51) para la determinación FV Leiden (Tablas 4 y 5). Con respecto a la determinación PT G20210A, presentaron genotipo homocigota normal (GG) 90,2 % (46/51), y genotipo heterocigota GA 9,8 % (5/51) (Tablas 6 y 7).

Tabla 3. Diagnósticos de los pacientes estudiados.

Diagnóstico	Frecuencia	Porcentaje (%) Total de Pacientes	Porcentaje (%) Pacientes con diagnóstico
TVP	29	15,1	42,6
TEP	8	4,2	11,8
ABORTOS	7	3,6	10,3
TEP/TVP	4	2,1	5,9
ACV	3	1,6	4,4
ANTECEDENTE FLIAR.	3	1,6	4,4
TROMBOSIS ARTERIAL	3	1,6	4,4
TV CEREBRAL	3	1,6	4,4
CARDIOPATIA	2	1	2,9
ACV/CARDIOPATIA	1	0,5	1,5
SAF	1	0,5	1,5
TEP/TVP/TROMBOSIS ARTERIAL	1	0,5	1,5
TVP/SAF	1	0,5	1,5
TVP/TVS	1	0,5	1,5
TVS	1	0,5	1,5
Total Pacientes con diagnóstico	68	35,4	100
SIN DATOS	124	64,6	
Total Pacientes estudiados	192	100	

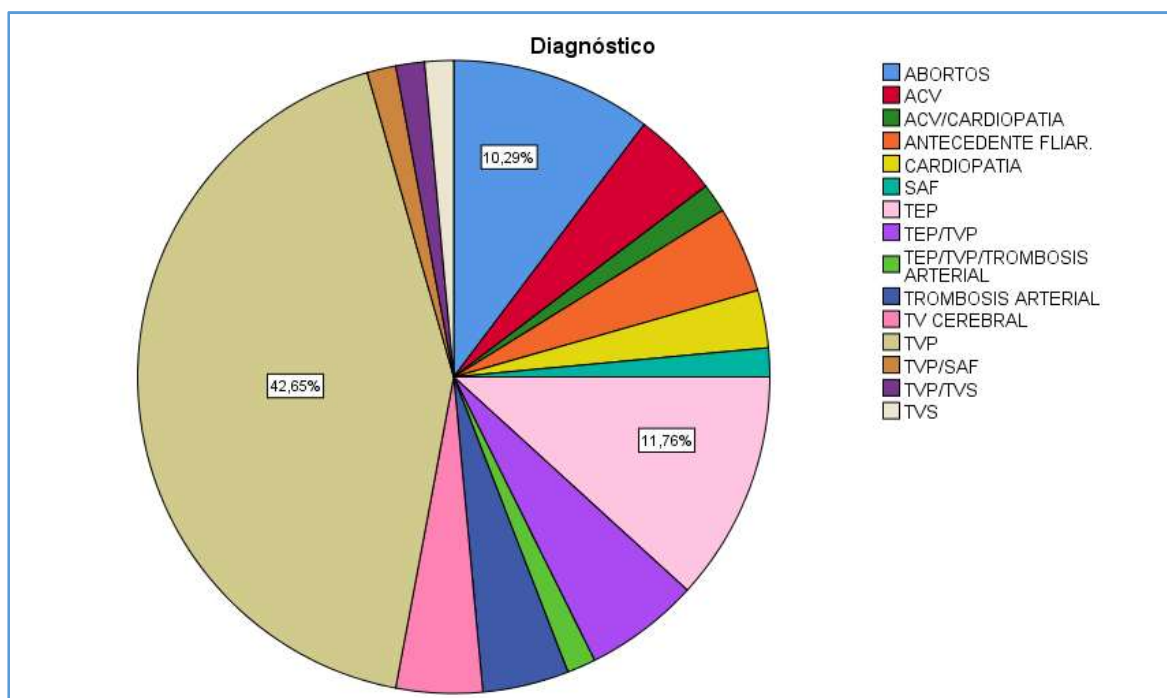


Figura 10: Gráfico circular de la población con diagnóstico.

Tabla 4. Polimorfismo Factor V Leiden en la población con diagnóstico.

Diagnóstico	Genotipos FV Leiden		Total
	GA	GG	
ABORTOS	1	6	7
ACV	1	2	3
ACV/CARDIOPATIA	0	1	1
ANTECEDENTE FLIAR.	0	3	3
CARDIOPATIA	0	2	2
SAF	0	1	1
TEP	0	8	8
TEP/TVP	0	4	4
TEP/TVP/TROMBOSIS ARTERIAL	0	1	1
TROMBOSIS ARTERIAL	0	3	3
TV CEREBRAL	1	2	3
TVP	2	27	29
TVP/SAF	0	1	1
TVP/TVS	1	0	1
TVS	0	1	1
TOTAL	6	62	68

Tabla 5. Análisis del polimorfismo FV Leiden en la población con diagnóstico de trombosis venosa o arterial.

Genotipos FV Leiden en pacientes con diagnóstico de trombosis	fi	Fi	hi	hi %	Hi %
GA	4	4	0.08	7.84	7.84
GG	47	51	0.92	92.16	100,0
Total	51		1.00	100,0	

fi: frecuencia absoluta, Fi: frecuencia absoluta acumulada, hi: frecuencia relativa simple, hi %: frecuencia relativa porcentual, Hi %: Frecuencia porcentual acumulada.

Tabla 6. Polimorfismo de la PT G20210A en la población con diagnóstico.

Diagnóstico	Genotipos PT G20210A			Total
	AA	GA	GG	
ABORTOS	0	0	7	7
ACV	1	0	2	3
ACV/CARDIOPATIA	0	1	0	1
ANTECEDENTE FLIAR.	0	2	1	3
CARDIOPATIA	0	0	2	2
SAF	0	0	1	1
TEP	0	1	7	8
TEP/TVP	0	2	2	4
TEP/TVP/TROMBOSIS ARTERIAL	0	0	1	1
TROMBOSIS ARTERIAL	0	0	3	3
TV CEREBRAL	0	0	3	3
TVP	0	1	28	29
TVP/SAF	0	0	1	1
TVP/TVS	0	0	1	1
TVS	0	1	0	1
TOTAL	1	8	59	68

Tabla 7. Análisis del polimorfismo PT G20210A en la población con diagnóstico de trombosis venosa o arterial.

Genotipos PT G20210A	fi	Fi	hi	hi %	Hi %
GA	5	5	0.098	9.8	9.8
GG	46	51	0.902	90.2	100.0
Total	51		1.0	100.0	

fi: frecuencia absoluta, Fi: frecuencia absoluta acumulada, hi: frecuencia relativa simple, hi %: frecuencia relativa porcentual, Hi %: Frecuencia porcentual acumulada.

4.3. Concordancia entre la determinación del polimorfismo FV Leiden y el test coagulométrico de Resistencia a la Proteína C Activada.

De los 192 individuos incluidos en este estudio, solamente 35,4 % (68) contaban con ambas determinaciones, el test coagulométrico RPCA y la determinación molecular FV Leiden.

Estos pacientes fueron divididos en dos grupos en base al resultado de la prueba molecular, aquellos con genotipo homocigota normal (GG) y con genotipo heterocigota mutado (GA). Ningún paciente de los estudiados resultó con genotipo homocigota A para la determinación FV Leiden.

Presentaron genotipo GG 91,18 % de los pacientes (62/68), en éstos, el valor promedio de RPCA fue de 2,52; mientras que el 8,82 % (6/68) con genotipo GA presentaron un valor promedio de RPCA de 1,66. En las tablas 8 y 9 se muestran los parámetros estadísticos correspondientes a los valores de RPCA de cada grupo de pacientes. En la figura 11, el gráfico Box Plot muestra la distribución de valores del test de RPCA en los dos grupos. Puede observarse, en el grupo con genotipo GG para el FV Leiden, que los valores mínimos más extremos (menores al cuartil 1) pueden coincidir con valores de RPCA del grupo con genotipo GA; esto indica que algunos pacientes que no presentaron el polimorfismo para el FV Leiden, tuvieron valores bajos de RPCA que se debieron a causas distintas del polimorfismo. Sin embargo, todos los pacientes con genotipo GA, presentaron valores de RPCA inferiores al punto de corte considerado normal para esta determinación.

Al analizar las medias del test de RPCA en el grupo de pacientes con genotipo GG y con genotipo GA, se observa una diferencia significativa, lo cual es indicativo de que existe una relación entre el resultado alterado del test de RPCA y la presencia del polimorfismo FV Leiden en los pacientes estudiados. La diferencia en las medias de ambos grupos se corrobora al aplicar la prueba T para muestras independientes que arroja un valor de significancia (p) de 0,00; es decir menor a 0,05. Esto indica que los valores de RPCA son distintos en los pacientes que presentan genotipo GA y GG, por lo cual existe una concordancia entre el valor de este test coagulométrico y la presencia

del polimorfismo FV Leiden. En la tabla 10 se muestran los resultados de la aplicación de dicha prueba.

Tabla 8. Parámetros estadísticos del test RPCA en pacientes con Genotipo GG para FV Leiden.

RPCA Genotipo GG Factor V Leiden	
Media	2,53
Intervalo de Confianza (95%): Límite Inferior	2,42
Límite Superior	2,63
Media recortada al 5%	2,53
Mediana	2,55
Varianza	0,17
Desviación estándar	0,41
Mínimo	1,70
Máximo	3,20
Rango	1,50
Rango intercuartil	0,65
Asimetría	-0,25
Curtosis	-0,68

Tabla 9. Parámetros estadísticos del test RPCA en pacientes con Genotipo GA para FV Leiden

RPCA Genotipo GA Factor V Leiden	
Media	1,66
Intervalo de Confianza (95 %): Límite Inferior	1,48
Límite Superior	1,85
Media recortada al 5%	1,66
Mediana	1,65
Varianza	0,03
Desv. Desviación	0,18
Mínimo	1,40
Máximo	1,90
Rango	0,50
Rango intercuartil	0,30
Asimetría	-0,14
Curtosis	-0,39

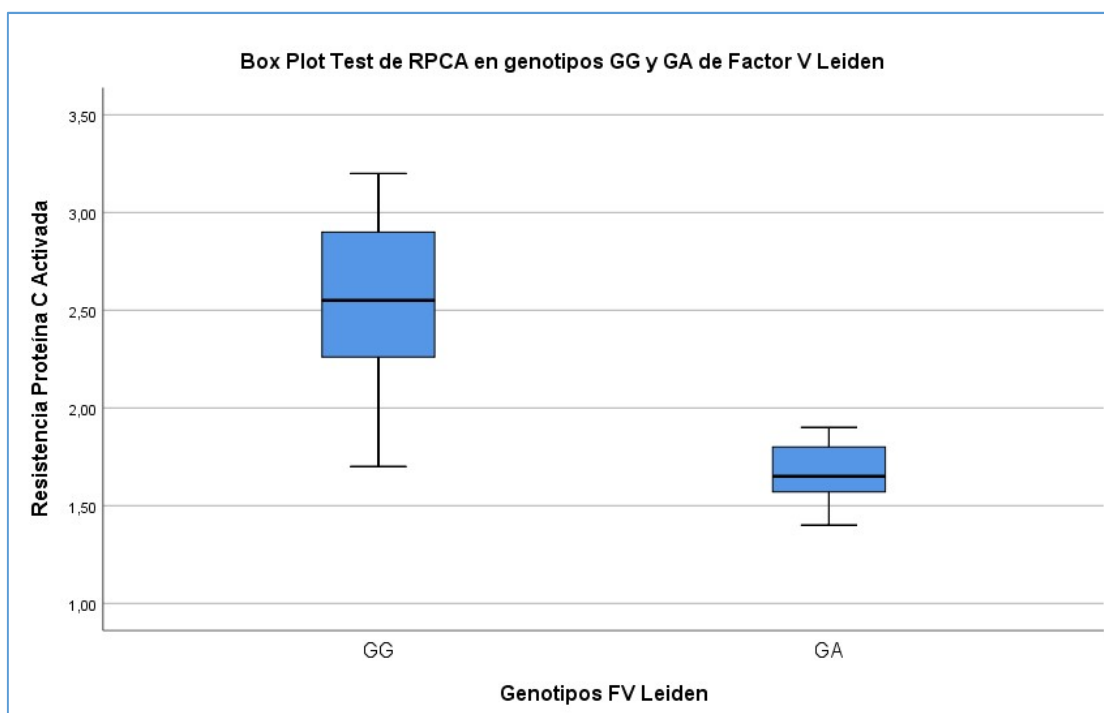


Figura 11. Gráfico Box Plot que muestra los valores de RPCA en los dos grupos de genotipos de FV Leiden.

Tabla 10. Resultados de la aplicación de la Prueba T para muestras independientes.

Prueba T para la igualdad de medias	
Valor de t	5,11
Grados de Libertad	66
Significancia bilateral (p valor)	0,00

4.4. Pruebas plasmáticas para el estudio de trombofilia: Proteína C, Proteína S libre, Antitrombina III.

Como se ha mencionado anteriormente, se registraron los datos correspondientes a pruebas plasmáticas realizadas a la población estudiada según lo solicitado en su pedido médico, debido a esto, no todos los individuos presentan datos de estas pruebas.

4.4.1. Proteína C

De los 192 individuos estudiados, el 50 % (96/192) tenían datos de esta determinación. Presentaron valores bajos el 7,3 % (7/96), mientras que 92,7 % (89/96) tuvieron valores normales. En ninguno de los pacientes que presentaron valores bajos se encontró el polimorfismo FV Leiden ni Protrombina G20210A. Solo dos de éstos pacientes presentaron datos acerca del motivo de su estudio, uno de ellos tenía antecedentes familiares de trombosis y otro se estudió por presentar cardiopatía.

Tabla 11. Frecuencias de la determinación de la Proteína C.

PROTEINA C	fi	Fi	hi	hi %	Hi %
BAJA	7	7	0,073	7,3	7,3
NORMAL	89	96	0,927	92,7	100
Total	96		1,000	100	

fi: frecuencia absoluta, Fi: frecuencia absoluta acumulada, hi: frecuencia relativa simple, hi %: frecuencia relativa porcentual, Hi %: Frecuencia porcentual acumulada.

4.4.2. Proteína S Libre

De la población estudiada, el 49,5 % (95/192) tenía datos de esta determinación. Presentaron valores bajos 8,4 % (8/95), y 91,6 % (87/95) tuvieron valores normales. De los 8 pacientes que tenían valores bajos, dos resultaron con genotipo GA para FV Leiden, ninguno presentó el polimorfismo G20210A de la protrombina. Seis de estos pacientes tenían datos acerca del motivo de su estudio, que resultaron ser abortos recurrentes, cardiopatía, ACV, TEP, TVP, TVS.

Tabla 12. Frecuencias de la determinación de la Proteína S Libre.

PROTEINA S LIBRE	fi	Fi	hi	hi %	Hi %
BAJA	8	8	0,084	8,4	8,4
NORMAL	87	95	0,916	91,6	100
Total	95		1,000	100	

fi: frecuencia absoluta, Fi: frecuencia absoluta acumulada, hi: frecuencia relativa simple, hi %: frecuencia relativa porcentual, Hi %: Frecuencia porcentual acumulada.

4.4.3. Antitrombina III

El 43,8 % (85/192) de la población estudiada tenían datos de esta determinación. Presentó valores bajos el 1,2 % (1/85), y resultaron con valores normales 98,8 % (84/85). El paciente que tuvo valores bajos no presentó ningún polimorfismo en las pruebas moleculares, y no hay datos acerca del motivo por el cual fue estudiado.

Tabla 13. Frecuencias de la determinación de la Antitrombina III.

ANTITROMBINA III	fi	Fi	hi	hi %	Hi %
BAJA	1	1	0,012	1,2	1,2
NORMAL	84	85	0,988	98,8	100
Total	85		1,000	100	

fi: frecuencia absoluta, Fi: frecuencia absoluta acumulada, hi: frecuencia relativa simple, hi %: frecuencia relativa porcentual, Hi %: Frecuencia porcentual acumulada.

5. Discusión

La trombosis es una patología multifactorial que se produce como resultado de la sumatoria de factores genéticos, adquiridos y desencadenantes. Dentro de los factores genéticos, los polimorfismos Factor V Leiden y Protrombina G20210A, son los más comúnmente hallados en trombofilias hereditarias. Teniendo en cuenta que el polimorfismo C677T de la MTHFR no es una prueba que se recomienda realizar en el algoritmo diagnóstico de pacientes con sospecha de trombofilia, debido a que no está totalmente probada su influencia en la patología trombótica.

Respecto a la prevalencia de las pruebas moleculares realizadas en este estudio, se puede decir que los resultados obtenidos son comparables a los observados en otros estudios realizados en nuestro país, en Chile y Brasil (Tabla 14).

En un estudio realizado en Argentina por Iglesias Varela *et al.* en 2001, se analizaron 192 pacientes con trombosis venosa, encontrándose un genotipo heterocigota para el

polimorfismo FV Leiden en el 9,9 % de los pacientes y en el caso del polimorfismo Protrombina G20210A un genotipo heterocigota en el 6,3%. No se encontraron pacientes homocigotas para estos polimorfismos en ninguna de las dos determinaciones moleculares.

En otro estudio realizado en Argentina por Genoud *et al.* en el año 2000, se analizaron 418 muestras correspondientes a controles sanos, los resultados obtenidos fueron 2,9 % genotipo GA para el FV Leiden y 2,6 % genotipo GA para la Protrombina G20210A. Como puede observarse es mucho menor la prevalencia encontrada para ambos polimorfismos, sin embargo, se trata de pacientes sanos por lo que estos resultados son esperables.

Ríos *et al.* en un estudio realizado en el año 2020 en la provincia de Tucumán – Argentina, analizaron las muestras de 39 mujeres en edad fértil que tuvieron un episodio trombótico. El 2,6 % de estas pacientes resultaron con un genotipo GA para FV Leiden y el 5,1 % tuvieron un genotipo GA para PT G20210A. En este grupo de pacientes los resultados son mayores para el polimorfismo de la Protrombina G20210A y la menor prevalencia encontrada de estos polimorfismos, respecto de los otros estudios realizados en Argentina y de los valores obtenidos en este trabajo, podría deberse al menor número de muestras y a las características de la población que se decidió estudiar.

En un estudio realizado en Chile (Palomo, *et al.* 2005) sobre 149 pacientes con trombosis, se obtuvo una prevalencia del 5,8 % para el genotipo GA del polimorfismo FV Leiden y del 5,8 % para el genotipo GA del polimorfismo Protrombina G20210A. Estos resultados son bastantes cercanos a los obtenidos en este trabajo, teniendo en cuenta la cercanía geográfica entre Chile y la provincia de Mendoza.

Herkenhoff *et al.* (2013) en un estudio realizado en Brasil, analizaron estos polimorfismos en un grupo de 100 pacientes con trombosis, obtuvieron una prevalencia de 6% para el genotipo GA de Factor V Leiden, y de 3 % para el genotipo GA de PT G20210A.

Otros estudios realizados en Venezuela (Lopez *et al.*, 2007) y Costa Rica (García Quesada *et al.*, 2021) muestran una prevalencia mucho mayor para el genotipo GA del polimorfismo FV Leiden y una prevalencia mucho menor para el polimorfismo de la PT G20210A. En sus respectivos estudios indican que es necesaria la realización de una

investigación más profunda teniendo en cuenta los casos clínicos y no solo la base de datos de estas determinaciones, además de realizar el estudio en una mayor cantidad de pacientes.

Tabla 14. Prevalencia de los polimorfismos del Factor V Leiden y la Protrombina G20210A en otros estudios.

ESTUDIO	PACIENTES	FVL			PT 20210		
		GG	GA	AA	GG	GA	AA
Genoud <i>et al.</i> , 2000 (Argentina)	C.S.: 418	97,1 % (406)	2,9 % (12)	0 %	97,4 % (407)	2,6 % (11)	0 %
Iglesias Varela <i>et al.</i> , 2001 (Argentina)	C.S.: 200	97 % (194)	3 % (6)	0 %	98 % (196)	2 % (4)	0 %
	C/ TV: 192	89,6 % (172)	9,9 % (19)	0,5 % (1)	93,7 % (180)	6,3 % (12)	0 %
Friedline <i>et al.</i> , 2001 (EEUU)	C/ TV: 401	91 % (365)	8 % (32)	1 % (4)	95 % (381)	5 % (20)	0 %
Palomo <i>et al.</i> , 2005 (Chile)	C.S.: 160	98,8 % (158)	1,2 % (2)	0 %	97,5 % (156)	2,5 % (4)	0 %
	C/ TV: 149	94,6 % (141)	5,4 % (8)	0 %	94,6 % (141)	5,4 % (8)	0 %
Lopez <i>et al.</i> , 2007 (Venezuela)	C.S.: 51	96,1 % (49)	3,9 % (2)	0 %	100 % (51)	0 %	0 %
	C/ TV: 44	81,8 % (36)	18,2 % (18)	0 %	97,7 % (43)	2,3 % (1)	0 %
Herkenhoff <i>et al.</i> , 2013 (Brasil)	C/ TV: 100	94 % (94)	6 % (6)	0 %	97 % (97)	3 % (3)	0 %
Ríos <i>et al.</i> , 2020 (Argentina)	C/ TV: 39	97,4 % (38)	2,6 % (1)	0 %	94,9 % (37)	5,1 % (2)	0 %
García Quesada <i>et al.</i> , 2021 (Costa Rica)	C/ TV: 134	72 % (96)	28 % (38)	0 %	97 % (131)	3 % (4)	0 %
Madkhaly <i>et al.</i> , 2021 (Arabia Saudita)	C/ TV: 1524 (FVL)	94,1 % (1434)	5,51 % (84)	0,39 % (6)	97,1 % (993)	2,83 % (29)	0,10 % (1)
	C/ TV: 1023 (PT 20210)						

Referencias: C.S.: Controles Sanos; C/TV: Pacientes con trombosis venosa.

Se debe tener en cuenta que la población estudiada en el presente trabajo no puede ser considerada como población general, ya que existe un sesgo, y es que estos pacientes concurren específicamente para realizar el estudio de trombofilia. Si bien solamente del 35,4 % de los mismos se tenía certeza de su diagnóstico, se puede suponer que el resto de los pacientes también ha tenido algún episodio de trombosis que motivó el pedido del estudio.

Dentro de la población que se consideró para tomar la prevalencia de los pacientes con trombosis venosa o arterial, como se especificó en los criterios de inclusión, solo se incluyó a aquellos pacientes que tuvieran específicamente el diagnóstico de trombosis

escrito en su historia clínica o en su pedido médico. Se excluyeron aquellos con diagnóstico de cardiopatía, SAF, abortos recurrentes y ACV, porque no se tenían datos acerca de si estos cuadros habían sido originados por una trombosis o por alguna otra causa. Los resultados obtenidos en este grupo de pacientes, no difiere mucho del obtenido en la población total estudiada; ya que, como se indicó anteriormente, es muy probable que todos los pacientes estudiados en el presente trabajo hayan tenido algún episodio trombótico.

Tres de los pacientes que se supo que fueron estudiados por tener familiares de primer grado con trombofilia, tampoco fueron incluidos dentro de la prevalencia de pacientes con trombosis, puesto que ellos no habían sufrido ningún episodio de trombosis. De estos pacientes hay que destacar a dos que resultaron con genotipo heterocigota para el polimorfismo Protrombina G20210A. Se trata de una pareja que fue estudiada específicamente ya que su hija resultó ser la paciente con genotipo homocigota para el polimorfismo Protrombina G20210A que se presenta en este trabajo. Esta paciente es una mujer de 29 años de edad al momento del estudio, que presentó dos episodios de ACV y fue estudiada a pedido de neurología, su caso es de particular relevancia, ya que, al presentar un genotipo homocigota de este polimorfismo, tiene mayor riesgo de recurrir en episodios de este tipo, por lo cual su tratamiento anticoagulante debe ser de por vida.

Otro de los pacientes estudiados por tener antecedentes familiares, fue una paciente de sexo femenino, que, si bien resultó con un genotipo normal para las pruebas moleculares, se comprobó una disminución en la prueba plasmática de la proteína C. Al ser consultada, refirió que el estudio se lo habían solicitado por tener un familiar de primer grado con déficit de proteína C. En estos casos es recomendable realizar la prueba en más de una oportunidad y hacer una anamnesis más profunda del paciente con el fin de asegurar ese resultado.

Con respecto a las pruebas plasmáticas para el estudio de trombofilia consideradas en este trabajo, la gran mayoría de los pacientes de los cuales se tenían datos, presentaron valores normales (más del 90 %), y solo algunos tuvieron valores alterados. Es importante tener en cuenta que dos pacientes que resultaron con valores bajos de Proteína S libre, además presentaron un genotipo heterocigota GA para FV Leiden. Se trata de una mujer

con diagnóstico de abortos recurrentes y un hombre con TVP y TVS. No se tiene conocimiento si estos pacientes estaban recibiendo terapia hormonal de alguna clase al momento en que fueron evaluados.

Cabe destacar que los resultados de estudios coagulométricos deben ser evaluados en el contexto de cada paciente y su comorbilidad. Estas pruebas deben ser realizadas en más de una oportunidad para confirmar los resultados y tomando en cuenta ciertas condiciones que debe cumplir el paciente en el momento de realizarlas, fundamentalmente no estar recibiendo medicación anticoagulante, y que haya pasado suficiente tiempo del episodio de trombosis.

En cuanto a la concordancia del test coagulométrico RPCA y la determinación molecular FV Leiden, si bien está probado que un genotipo heterocigota (GA) u homocigota (AA) para dicho polimorfismo, debe ir acompañado de una alteración en la RPCA; en este trabajo lo hemos podido comprobar con un test estadístico, aunque solo pudimos incluir a 6 pacientes que presentaron genotipo heterocigota y tenían datos del test de RPCA. De todas maneras, a pesar de que se tenía una pequeña muestra, es importante comprobar la coincidencia de ambas determinaciones, ya que esto nos da la posibilidad utilizar el test de RPCA como un screening, sobre todo para aquellos laboratorios que no cuentan con la posibilidad de realizar pruebas moleculares. Ante un resultado alterado en el test de RPCA, debe realizarse el estudio del polimorfismo FV Leiden, pudiéndose encontrar presente o no.

6. Conclusión

El objetivo principal de este trabajo fue obtener la prevalencia de los polimorfismos genéticos FV Leiden y PT G20210A en pacientes sometidos al estudio de perfil trombofílico en un hospital de referencia en Mendoza. No solo se pudo comprobar que los valores de prevalencia obtenidos se corresponden con los presentados en otros trabajos en cuanto a población que ha sufrido un primer evento trombótico (Tabla 14); si no también se pudo observar que las pruebas moleculares son solicitadas, en muchos

casos, para completar el perfil de pruebas trombofílicas y también para establecer un factor de riesgo genético, que sumado a la presencia de otros factores podría aumentar la recurrencia de eventos trombóticos. La identificación de estos polimorfismos es importante porque puede contribuir a la evaluación y manejo de estos pacientes.

Por otro lado, es recomendable la realización de un estudio prospectivo más amplio, teniendo en cuenta el resultado de las determinaciones moleculares analizadas en este trabajo con otros factores de riesgo presentes en los pacientes. Esto permitiría realizar un análisis más profundo de cada caso en particular para determinar la influencia del factor de riesgo genético y la aplicación de la terapia más adecuada en cada paciente.

7. Bibliografía:

1. AGRAWAL, N. [et. al]. Resistencia a la proteína C activada en casos de trombosis venosa profunda. *Ann Vasc Surg* 2009; 23: 364-366.
2. ALTUNA, D. [et. al]. Trombofilias. Guías de Diagnóstico y Tratamiento. Sociedad Argentina de Hematología. 2021; pág. 245-254.
3. AUSTIN, M.A. [et. al]. Guidelines fo the Nacional Heart, Lung, and Blood Institute Working Group on Blood Drawing, Processing and Storage for Genetic Studies. *Am J Epidemiol*. 1996; 144:437-441.
4. BERTINA, R.M.[et. al]. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994 Vol. 369.
5. BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLER, B.S.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U. *Williams Hematología*. 6° Edición. Editorial Marbán. Madrid, España, 2007.
6. CERESSETTO, J. [et. al]. Trombofilia y Embarazo. Guías de Diagnóstico y Tratamiento. Sociedad Argentina de Hematología. 2021; pág. 255-260.
7. COMP P.C.; ESMON C.T. Recurrent venous thromboembolism in patients with partial deficiency of protein S. *N Eng J Med*. 1984; 311: 1525-8.
8. DAUTAJ, A. [et. al]. Hereditary thrombophilia. Review. *Acta Biomed* 2019; Vol 90, Supplement 10: 44-46.
9. EGEBERG O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh*. 1965; 13: 515-30.
10. FROSST P. [et. al]. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10(1):111-3.
11. FRIEDLINE, J.A. [et. al]. Combined Factor V Leiden and Prothrombin Genotyping in patients presenting with thromboembolic episodes. *Arch Pathol Lab Med*. Vol 125, January 2001.
12. GARCIA QUESADA, J. [et. al]. Prevalencia de mutaciones metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), protrombina (II G20210G/G20210A) y factor V Leyden en pacientes sometidos a estudio por perfil trombofílico en el Hospital San Vicente de Paúl, Costa Rica, 2017-2018. *Población y Salud en Mesoamérica*, 19(1). Doi: 10.15517/psm.v19i2.43749.

13. GENOUD, V. [et. al]. Prevalence of Three Prothrombotic Polymorphisms: Factor V G1691A, Factor II G20210A and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C 677T in Argentina. *Thrombosis Research* 100 (2000) 127–131.
14. GRANDE RATTI, M.F. [et. al]. Incidencia de la enfermedad tromboembólica venosa adquirida en la internación. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Córdoba*. 2018; 75(2): 82-87.
15. GRIFFIN J.H. [et. al]. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest*. 1981; 68: 1370-3.
16. GUILLERMO, C. [et. al]. Estudio de trombofilia en Latinoamérica. *Hematología*. Volumen 21, número 1: 22-30, 2017.
17. HERNANDEZ CUERVO H.; USME S.; JUNIS J.J. Genotipos asociados a trombofilias. *Biomédica* 2014; 34:132-42.
18. HERKENHOFF, M.E. [et. al]. Analysis of factor V Leiden and prothrombin mutations in patients with suspected thrombophilia in Sao Paulo state – Brazil. *J Bras Patol Med Lab*, v. 49, n. 3, p. 169-173, junho 2013.
19. IGLESIAS VARELA, M.L. [et. al]. Major and potential prothrombotic genotypes in a cohort of patients with venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2001; 104(1): 317-324.
20. LÓPEZ, T. [et. al]. Frecuencia de la mutación del factor V Leiden y protrombina G20210A en pacientes con tromboembolismo venoso. *Salus*, vol. 11, núm. 3, diciembre, 2007, pp. 37-40.
21. MADKAHALY, F. [et. al]. Prevalence of positive factor V Leiden and prothrombin mutations in sample tested for thrombophilia in Saudi Arabia. *Am J Blood Res* 2021; 11 (3): 255-260.
22. NOROÑA CALVACHI, C.D. Trombofilias Hereditarias. Review. *Rev Cient Cienc Med* 2015; 18 (1): 43-49.
23. PALOMO, I. [et. al]. Factor V Leiden y mutación de la Protrombina G20210A en pacientes con trombosis venosa y arterial. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 1425-1433.
24. POORT, S.R. [et. al]. A common genetic variation in the 3' untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996; 88: 3698-3703.

25. POUDEL, S. [et. al]. Association of G20210A prothrombin gene mutation and cerebral ischemic stroke in young patients. *Cureus*. 2020. 12(12): e11984.
26. RIOS, M. [et. al]. Study of hereditary thrombophilia (factor V Leiden and Prothrombin 20210) in a population of women in fertile age who suffered a thromboembolic event studied in the Tucumán public health laboratory. *J Cardiol Curr Res*. 2020; 13(2): 35-39.
27. SIERRA AISA, C. [et. al]. Trombofilia y Trombosis. *Medicine*. 2016; 12 (22): 1284-92.
28. TORRES MARTEL, J.M.; BAUTISTA HERNANDEZ, K.M. Trombofilia hereditaria y trombo intracardíaco. *Rev Colomb Cardiol*. 2018; 25 (3): 238.e1-238.e4.
29. UBALDINI, J. [et. al]. Consenso de Enfermedad Tromboembólica Aguda. *Rev Argent Cardiol* 2016; 84: 74-91.
30. VARGAS RUIZ, A.G. Trombofilias Hereditarias: el perfil de pruebas necesarias. *Hematol Méx*. 2019 abril – junio; 20(2): 79-85.
31. ZABALEGUI MERINO, N. Prevalencia del Factor V Leiden y la mutación G20210A de la Protrombina en Navarra, y su papel como factores de riesgo trombótico. Universidad de Navarra. 2000; ISBN 84-8081-108-0.
32. ZAVALA – HERNÁNDEZ, C. Asociación de la RPCA con mutaciones Leiden y Cambridge del factor V de la coagulación en pacientes mexicanos con trombofilia primaria. *Cirugía y Cirujanos*, vol. 78, núm. 2, marzo-abril, 2010, pp. 131-136.

8. ANEXO I

Tabla de datos de la población estudiada

SEXO	EDAD	FVL	Genotipo FV	PT 20210	Genotipo PT	RPCA	PROT C	PSL	ATIII	DIAGNÓSTICO
M	57	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,23	NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVP
F	42	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,26	NORMAL	BAJA	NORMAL	ACV
F	25	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL		
F	32	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,44	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	36	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,64				ABORTOS
M	53	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	44	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	37	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,32	NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVP
M	29	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVP
M	45	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG					
M	53	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVP
F	29	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	3,2	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	47	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,65	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	21	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,5	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	22	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	16	NEGATIVO	GG	POSITIVO HET	GA	2,37	NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVS
M	54	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TVP
M	35	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TVP
F	26	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,49	NORMAL	BAJA		
F	26	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	35	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	55	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TVP
F	23	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,6	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	33	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,6	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	45	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					FAV-IRC
F	33	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	22	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,5	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	55	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG					
F	56	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	46	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	38	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,6	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	49	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	37	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,6	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	34	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	49	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TVP
F	25	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	24	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,7	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	30	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	26	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	3	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	52	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,6	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	45	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	47	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	23	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	60	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG	1,8	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	51	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVP
M	42	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,5	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	25	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,1	NORMAL	NORMAL	NORMAL	SAF
F	37	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG	1,6	NORMAL	NORMAL	NORMAL	ACV
F	31	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	42	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG					

SEXO	EDAD	FVL	Genotipo FV	PT 20210	Genotipo PT	RPCA	PROT C	PSL	ATIII	DIAGNÓSTICO
M	48	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	33	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	37	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,8	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	59	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	28	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,6	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	40	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,3	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	43	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	58	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVP
F	36	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		BAJA	NORMAL	NORMAL	
F	49	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	48	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	48	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	60	NEGATIVO	GG	POSITIVO HET	GA		NORMAL	NORMAL	NORMAL	TEP-TVP
F	52	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,9	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	58	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,2	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	35	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,9	NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVP-SAF
F	19	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,8	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	23	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL		
F	37	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	23	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	25	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TVP
M	36	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	54	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TEP-TVP
F	29	NEGATIVO	GG	POSITIVO HOMOCIGOTA	AA					ACV
M	57	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TEP
M	27	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	3,2	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	39	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	29	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,4	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	38	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TEP
F	31	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,6	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	35	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	42	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	37	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG					TVP
M	28	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					ACV-TROMBOSIS ARTERIAL
F	31	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVP
M	67	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	33	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	31	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	34	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	27	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	45	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	28	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	19	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	27	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	23	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,2	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	33	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG	1,7	NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVP
M	20	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	1,7	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	39	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	1,7	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	48	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,8	NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVP
F	62	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TVP
F	42	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					

SEXO	EDAD	FVL	Genotipo FV	PT 20210	Genotipo PT	RPCA	PROT C	PSL	ATIII	DIAGNÓSTICO
M	48	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	3	NORMAL	BAJA	NORMAL	TEP
M	52	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TEP
F	46	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TV CEREBRAL
M	31	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TEP-TVP-TROMBOSIS ARTERIAL
M	35	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	64	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,05	NORMAL	NORMAL	NORMAL	TV ESPLÉNICA - SMPC
F	54	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	30	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	1,8	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	26	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG					
F	19	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG					TV CEREBRAL
F	28	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	21	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	26	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	1,8				
M	43	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG				NORMAL	ACV-IAM-TVP
F	32	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL			
M	50	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	31	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	60	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	1,8	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	38	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2	NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVP
F	53	NEGATIVO	GG	POSITIVO HET	GA					TVP
F	28	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		BAJA	NORMAL	NORMAL	
F	41	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVP
M	32	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TROMBOSIS ARTERIAL- IAM
M	51	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	18	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG					
M	37	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG	1,4	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	28	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	35	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	1,8	NORMAL	NORMAL		
F	37	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,4	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	45	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	3,2	BAJA	BAJA	NORMAL	IAM-IRC
M	23	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL		
F	36	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TV CEREBRAL
F	35	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		BAJA	NORMAL	NORMAL	
M	40	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TROMBOSIS ARTERIAL
M	29	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,2	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	40	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,5	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	47	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	47	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG		NORMAL	BAJA		TVP-TVS
M	39	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TVP-LNH-HIV
F	50	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TVP
F	45	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	25	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	35	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL		
F	51	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TEP-TVP
F	15	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	52	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	3,1	NORMAL	NORMAL		TVP
F	59	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	3,1	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	52	NEGATIVO	GG	POSITIVO HET	GA					ANTECEDENTE FLIAR.
M	52	NEGATIVO	GG	POSITIVO HET	GA					ANTECEDENTE FLIAR.
F	27	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					

SEXO	EDAD	FVL	Genotipo FV	PT 20210	Genotipo PT	RPCA	PROT C	PSL	ATIII	DIAGNÓSTICO
F	30	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,3				
F	47	NEGATIVO	GG	POSITIVO HET	GA	2,8	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	40	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG	1,9	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	38	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TVP
M	31	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	35	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	34	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		BAJA	NORMAL	NORMAL	
F	60	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	29	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
M	28	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					TEP
F	37	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG					
F	39	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	37	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	ABORTOS
F	40	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	64	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	20	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	28	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		BAJA	NORMAL	NORMAL	ANTECEDENTE FLIAR.
F	66	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	3	BAJA	BAJA	BAJA	
F	26	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,9	NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVP
M	35	NEGATIVO	GG	POSITIVO HET	GA		NORMAL	NORMAL		TEP-TVP
F	33	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	3,1	NORMAL	NORMAL	NORMAL	ABORTOS
M	55	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	3,1	NORMAL	BAJA		TVP
M	36	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					ABORTOS
M	40	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	42	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	34	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	51	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	3	NORMAL	NORMAL	NORMAL	TEP
F	32	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,9				ABORTOS
F	44	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,3	NORMAL	NORMAL	NORMAL	TVP
F	77	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	TEP
F	28	NEGATIVO	GG	POSITIVO HET	GA					ACV-CARDIOPATIA
F	23	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,9	NORMAL	NORMAL		TVP
F	37	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,5				ABORTOS
F	42	NEGATIVO	GG	POSITIVO HET	GA	2,6				TEP
F	50	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	26	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG		NORMAL	NORMAL	NORMAL	
F	42	POSITIVO HET	GA	NEGATIVO	GG	1,57	NORMAL	BAJA	NORMAL	ABORTOS
F	33	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG	2,43	NORMAL	NORMAL	NORMAL	
M	61	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	43	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					
F	36	NEGATIVO	GG	NEGATIVO	GG					

