



Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

**DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO g.10976G>A DEL GEN DEL
FACTOR VII DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA Y SU RELACIÓN
CON DISTINTAS PATOLOGÍAS TROMBÓTICAS.**

Trabajo Especial de Grado

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela por la Br. Vanessa Carolina Rivero Perdomo como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutores: Dra. Antonietta Porco (USB)

Dra. Guillermina Alonso (UCV)

Caracas – Venezuela

Febrero – 2011

RESUMEN

Las enfermedades trombóticas son la primera causa de morbilidad y mortalidad en el mundo, dentro de las cuales las más frecuentes son el infarto agudo al miocardio (IAM), el accidente cerebro vascular (ACV) y la trombosis venosa profunda (TVP), lo que representa un problema de salud pública y pérdidas humanas. Existen factores tanto ambientales como genéticos que predisponen a estados hipercoagulabilidad, lo cual puede generar la activación de un conjunto de mecanismos que promueven la formación de una barrera o coágulo. Diversos estudios han sugerido que la presencia de polimorfismos genéticos en los genes que codifican para algunos factores de coagulación pudiera estar relacionada con la ocurrencia de trombosis arterial o venosa. Una de las proteínas de la coagulación que ha sido involucrada con el riesgo de padecer patologías trombóticas es el factor VII. Se han detectado distintos polimorfismos asociados a este gen, uno de los cuales es el polimorfismo g.10976 G>A, el cual se ha relacionado con la variación de los niveles plasmáticos de la proteína de forma activa. En consecuencia, se ha tratado de relacionar el polimorfismo con distintas patologías trombóticas. El objetivo de este trabajo fue determinar el genotipo del polimorfismo g.10976 G>A, en el gen que codifica para el factor VII de la coagulación, en pacientes que han sufrido infarto agudo al miocardio (IAM), trombosis venosa profunda (TVP) y accidente cerebro vascular (ACV) y establecer si existe una relación con el desarrollo de estas patologías. El análisis de genotipos fue realizado mediante la técnica PCR-RFLP a partir del ADN genómico de 103 pacientes que han sufrido IAM, 101 pacientes que han padecido de TVP y 69 pacientes que han sufrido ACV. Sólo se encontró asociación entre el alelo de riesgo A del polimorfismo y la presencia de IAM (OR=1,92 1,02-3,61, p valor < **0,05**). Además mediante un modelo de regresión de curva logística, se obtuvo que los factores de riesgo principalmente asociados al IAM fueron el hábito tabáquico, la edad y el sexo masculino, mientras que para el desarrollo de TVP, uno de los factores de riesgo más significativo fue el sexo femenino. Según los resultados obtenidos en este trabajo, la presencia del alelo A del polimorfismo g.10976 G<A en conjunto de los factores ambientales tales como edad, sexo, hipertensión arterial, en el gen que codifica para el factor VII de la coagulación sanguínea, puede ser considerado como un factor predictivo para la presencia de IAM.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	7
II.	OBJETIVOS	10
II.1	Objetivo general	10
II.2	Objetivos específicos.....	10
III.	MARCO TEÓRICO.....	11
III.1	Sistema Circulatorio.....	11
III.2	Hemostasia sanguínea	13
III.2.1	Hemostasia primaria.	14
III.2.2	Hemostasia secundaria o coagulación sanguínea.....	15
III.3	Fibrinólisis	21
III.4	Trombosis.	22
III.4.1	Trombosis arterial	23
III.4.2	Trombosis venosa	25
III.5	Factores de riesgo	27
III.5.1	Factores genéticos.....	28
III.6	Factor VII de la coagulación.....	29
III.7	Justificación	35
IV.	METODOLOGÍA	38
IV.1	Selección de pacientes	38
IV.2	Obtención de muestra	38
IV.3	Aislamiento de ADN genómico.....	40
IV.4	Amplificación del fragmento contentivo del polimorfismo g.10976 G>A mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
IV.5	Detección del polimorfismo g.10976 G>A mediante ensayo de restricción enzimática (RFLP) con la endonucleasa <i>MspI</i>	42
IV.6	Electroforesis en geles de Agarosa	43
IV.7	Electroforesis en geles de poliacrilamida	44
IV.8	Secuenciación	44
IV.9	Análisis estadístico	46
IV.10	Financiamiento	49

V.	RESULTADOS.....	50
V.1	Análisis descriptivo de la población de estudio	50
V.2	Análisis Molecular	52
V.2.1	Aislamiento de ADN genómico (ADNg).....	52
V.2.2	Determinación del genotipo para el polimorfismo g.10976 G>A mediante la técnica PCR-RFLP en controles y pacientes con IAM, ACV y TVP	53
V.3	Frecuencias genotípicas y alélicas.	57
V.4	Evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W).....	60
V.6	Análisis estadístico de la población de estudio	62
V.6.1	Análisis estadístico univariado del polimorfismo g.10976 G>A, y su relación con el infarto agudo al miocardio (IAM), trombosis venosa profunda (TVP) y accidente cerebro vascular (ACV).	62
V.6.2	Interacción del polimorfismo g.10976 G>A junto a otros factores de riesgo en el desarrollo de las diferentes patologías trombóticas.	63
VI.	DISCUSIÓN	66
VI.1	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo g.10976 G<A de los diferentes grupos de estudio	67
VI.2	Asociación del genotipo del polimorfismo g.10976 G<A con las diferentes patologías trombóticas.....	70
VI.3	Posible efecto del alelo A del polimorfismo g. 10976 G<A en la funcionalidad del FVII.....	73
VI.4	Otros factores de riesgo asociados con el riesgo de desarrollar patologías trombóticas.	76
VII.	CONCLUSIONES	82
VIII.	RECOMENDACIONES	84
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
X.	ANEXOS	94

Índice de Figuras

Figura 1. Composición de los vasos sanguíneos.....	12
Figura 2. Vías que conforman el Modelo de Cascada de Coagulación.....	17
Figura 3. Fases del modelo celular de la coagulación.....	20
Figura 4. Esquema del funcionamiento del sistema fibrinolítico.....	22
Figura 5. Evolución de la acumulación de placa de ateroma.....	24
Figura 6. Trombosis Venosa Profunda.....	26
Figura 7. Representación gráfica de las regiones del gen del FVII.....	29
Figura 8. Secuencia de aminoácidos y estructura tentativa de la proteína factor VII.....	31
Figura 9. Dominio catalítico de la proteína factor VII de la coagulación.....	32
Figura 10. Diagrama de plan de trabajo.....	39
Figura 11. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.....	52
Figura 12. Fragmentos obtenidos del corte enzimático con la endonucleasa <i>MspI</i>	54
Figura 13. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 2,5%.....	54
Figura 14. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 3%.....	56
Figura 15. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%.....	56
Figura 16. Composición de todos los grupos de estudio que constituyen la población de estudio según su genotipo para el polimorfismo g.10976 G>A.....	58
Figura 17. Registro fotográfico de un electroferograma.....	61
Figura 18. Registro fotográfico de un electroferograma.....	61
Figura 19. Registro fotográfico de un electroferograma.....	62

Índice de Tablas

Tabla 1. Nomenclatura de los factores de coagulación.....	15
Tabla 2. Programa utilizado para realizar la PCR.....	42
Tabla 3. Compuestos y concentraciones que deben mezclarse para la realización de la digestión enzimática.....	43
Tabla 4 . Parámetros de la población.....	51
Tabla 5. Resultado de las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas para el polimorfismo g.10976 G>A para cada grupo de la población d estudio.....	59
Tabla 6. Análisis del equilibrio de H-W para el polimorfismo g.10976 G>A ubicado en individuos sanos como muestra representativa de la población venezolana.....	60
Tabla 7. Relación de las poblaciones estudiadas con la presencia del alelo A, a través de la razón de proporciones.....	63
Tabla 8. Análisis de regresión logística bivariada del impacto de distintos factores de riesgo en el desarrollo de IAM, TVP y ACV.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

α 2-AP: α 2-antiplasmina
AA: Homocigoto mutado
ACV: Accidente Cerebro Vascular
ADN: Ácido desoxirribonucleico.
ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia.
CO₂: Dióxido de Carbono
AT-III: Anti-trombina III.
EDTA: Ácido tetilendiaminotetraacético.
EP: Embolismo Pulmonar
FONACIT: Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Investigación.
FII: Factor II (protrombina)
FVa: Factor V activado.
FVIIa: Factor VII activado.
FVIIIa: Factor VIII activado.
FIXa: Factor IX activado.
FXa: Factor X activado.
FXIIa: Factor XII activado.
FVIIag: Factor VII antigénico
FVIIc: Factor VII coagulante
FT: Factor Tisular
GA: Heterocigoto
GG: Homocigoto normal
H-W: Hardy Weimberg
IVIC: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.
IAM: Infarto Agudo al Miocardio.
LGMHB: Laboratorio de Genética Molecular y Humana B.
MPPS: Ministerio del Poder Popular para la Salud
O₂: Oxígeno
OR: odds-ratio
PAI-1: Inhibidor de activador del plasminógeno tipo I.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
Pg: Plasminógeno.
Pn: Plasmina
RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
SDS: Dodecilsulfato sódico.
SC: Sistema Circulatorio.
TAE: Tris acetato EDTA.
TAFI: Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina.
TAG: Triacilglicerol
TVP: Trombosis Venosa Profunda
t-PA: Activador tipo tisular del plasminógeno.
u-PA: Activador tipo uroquinasa del plasminógeno
VLDL: Lipoproteína de Baja Densidad.

I. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los mecanismos fisiológicos que involucran los procesos que integran la hemostasia, nos permite un mejor diagnóstico y tratamiento de las enfermedades hemorrágicas y trombóticas. Las enfermedades trombóticas, las cuales se deben a la formación de un trombo o coágulo en un vaso sanguíneo sin que ocurra una lesión, constituyen, según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud en el 2010, la principal causa de muerte en el mundo, con 17 millones de muertes anuales, ocasionando un grave problema de salud pública mundial (Martínez-Maurillo y Quintana, 1996; Miño, 2004).

Entre las enfermedades trombóticas se encuentran las del tipo arterial y la venosa. Entre las arteriales, las más representativas y de importancia para este estudio, son el Infarto Agudo al Miocardio (IAM) y el Accidente Cerebro Vascular (ACV), generando notable incapacidad física y laboral. Por su parte, se encuentra la enfermedad trombo embólica venosa, la cual se caracteriza por la presencia de padecimientos estrechamente relacionados entre sí: la Trombosis Venosa Profunda (TVP) y el Embolismo Pulmonar (EP). La patología mencionada se inicia con el primer padecimiento en las extremidades inferiores, y hasta en el 50% de los casos puede complicarse con el segundo (EP) (Cabrera y col., 2010).

La Sociedad Venezolana de Hipertensión ha reportado que en Venezuela, las enfermedades vasculares representan la primera causa de muerte. Las estadísticas muestran que para el año 2007, el infarto agudo al miocardio representó el 20,6% de las muertes y el accidente cerebro vascular un 7,7%. El Ministerio del Poder Popular Para la Salud (MPPS) reportó en el 2008, que la incidencia de patologías como el IAM, son la primera causa de muerte representando el 21,9 % de la población, además reportó, que el ACV representó el 7,76% de mortalidad en la

población venezolana. Para el caso de las patologías tromboticas venosas, no se han reportado ningún tipo de estadísticas, pero la Sociedad Venezolana de Traumatología y Ortopedia reportó en el año 2006, que en Venezuela se observan cerca de 30.000 casos de este tipo de patologías, lo cual implica una enorme probabilidad de presencia de TVP y / o EP en la sociedad venezolana (Hernández, 2007).

Debido a la alta incidencia de este tipo de patologías en el mundo, se ha hecho imperativo por parte de los científicos conocer las causas por las cuales ésta se produce, las medidas para limitar el daño ocurrido y las formas para lograr disminuirlo, para así reducir su incidencia.

Se han descrito distintos factores de riesgo que generan una mayor probabilidad de padecer este tipo de patologías, y en el caso particular de las enfermedades tromboticas arteriales, los más representativos son: la hipertensión arterial, la aterosclerosis, el tabaquismo, la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus y la obesidad. Por su parte, en el caso de las patologías tromboticas venosas, los factores de riesgo más representativos son: la estasis venosa, los estados de hipercoagulabilidad, la obesidad y las lesiones endoteliales. Por último y aplicable en ambos tipos de patologías, se encuentran aquellos factores inherentes no modificables como la edad avanzada, el sexo y las variantes de tipo genético (Benítez y col., 2004; Ciruzzi y col., 2002; Urda y col., 1998).

Entre los factores genéticos, se han descrito numerosas variaciones en los genes que codifican para las proteínas involucradas en el proceso de coagulación y fibrinólisis, que afectan al sistema hemostático. En distintos estudios se han reportado variantes ubicadas en los genes que codifican para los factores V, VIII y XII de la coagulación, así como la proteína protrombina, las cuales han sido asociadas con la predisposición a sufrir trombosis venosa. Existen otros trabajos en los cuales se han reportado otros tipos de variantes en genes que

codifican para distintas proteínas como son: el fibrinógeno y los factores V y XII de la coagulación, las cuales han sido también asociadas con la predisposición de sufrir trombosis arterial. Además, en diversos estudios se han reportado distintos polimorfismos en los genes que codifican para otras proteínas involucradas en el proceso de coagulación, entre los cuales se encuentra el polimorfismo g.10976 G>A, ubicado en el exón 8 del gen que codifica para el factor VII de la coagulación sanguínea, siendo este genotipo relacionado con los niveles de la proteína en plasma. Se ha reportado que altos niveles de este factor puede generar una predisposición a las patologías trombóticas. Sin embargo, esta relación no ha sido claramente establecida ya que se han obtenido resultados controversiales en distintos estudios. Esto es debido a que en algunos casos, existe un tamaño poblacional inadecuado y en consecuencia la falta de poder estadístico. Hasta el momento en Venezuela no se ha realizado ningún trabajo relacionado con este tema en poblaciones de pacientes que han sufrido ACV, TVP e IAM, así como tampoco se ha determinado la frecuencia del polimorfismo g.10976 G>A en la población (Iacoviello y col., 1998; Lane y Grant, 2000; Nour y col., 2005; Ogawa y col., 2004). En este sentido, en el Laboratorio de Genética Molecular y Humana B (LGMHB) de la Universidad Simón Bolívar, se investigan las alteraciones genéticas que afectan genes involucrados en el proceso de coagulación sanguínea y el sistema fibrinolítico, y su relación con las patologías trombóticas, como parte de un proyecto de investigación multicéntrico titulado: “Diagnóstico Molecular de los Polimorfismos Genéticos asociados a la Trombosis Arterial y Venosa”. Específicamente en este trabajo se propuso investigar el genotipo del polimorfismo g.10976 G>A en el gen del factor VII de la coagulación, a partir de una muestra caso-control en Venezuela y su relación con el IAM, el ACV y la TVP, tomando en cuenta la interacción con los distintos factores de riesgo.

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo general

- Determinar el genotipo del polimorfismo g.10976 G>A en el gen del factor VII de la coagulación sanguínea en pacientes venezolanos que han sufrido de infarto agudo al miocardio (IAM), trombosis venosa (TV) y accidente cerebro vascular (ACV) e individuos aparentemente sanos (controles), con el fin de investigar su posible relación con el desarrollo de las patologías.

II.2 Objetivos específicos

- Determinar el genotipo del polimorfismo g.10976 G>A en el gen que codifica para el factor VII de la coagulación sanguínea mediante el empleo de la técnica PCR-RFLP en pacientes que han sufrido de infarto agudo al miocardio, trombosis venosa, accidente cerebro-vascular y población control.
- Correlacionar el genotipo del polimorfismo g.10976 G>A con factores de riesgo adquiridos y su asociación con el infarto agudo al miocardio, trombosis venosa y accidente cerebro-vascular.

III. MARCO TEÓRICO

La sangre es un tejido fluido constituido por distintas células y el plasma. En la fracción líquida del tejido, se ubican múltiples sustancias disueltas, siendo las más abundantes las proteínas, las cuales transitan por un sistema cerrado denominado sistema circulatorio.

III.1 Sistema Circulatorio.

El sistema circulatorio (SC) es un sistema cerrado encargado de distribuir la sangre en todo el organismo, obteniendo los nutrientes, el oxígeno y otras sustancias necesarias para el metabolismo celular. Está constituido por el corazón, órgano que bombea la sangre a través de todo el organismo con una presión adecuada; y los diferentes tipos de vasos sanguíneos: arterias, venas y capilares. Las arterias llevan la sangre del corazón hacia los capilares, las venas retornan la sangre de los capilares al corazón y los capilares constituyen la mayor superficie de todos los tipos de vasos sanguíneos y es donde ocurre un intercambio bidireccional entre la sangre y los demás tejidos, transportando oxígeno (O_2) y metabolitos principalmente, así como intercambiando dióxido de carbono (CO_2) y productos de desecho (Mckenzie, 1999).

El corazón (órgano especializado en propulsar la sangre a todo el organismo) y los vasos sanguíneos, muestran una estructura general representada por tres capas o tunicas concéntricas: una capa interna, compuesta por un epitelio plano simple o endotelio, el cual además de cumplir funciones de soporte de los vasos sanguíneos, también produce una serie de moléculas biológicamente activas, las cuales son liberadas como respuesta a una variedad de estímulos fisiológicos, la membrana basal y la capa subendotelial de tejido conectivo laxo; una capa media, representada por estratos circunferenciales de fibras musculares lisas, entre las cuales se hallan

fibras elásticas y de colágeno; y por último una capa externa, constituida por tejido conectivo denso, el cual se une con el tejido conectivo laxo que rodea por fuera a los vasos (Figura 1). Cada una de los vasos sanguíneos presenta características relacionadas con la función que realizan, lo que modifica su estructura general (Simón y col., 2001).

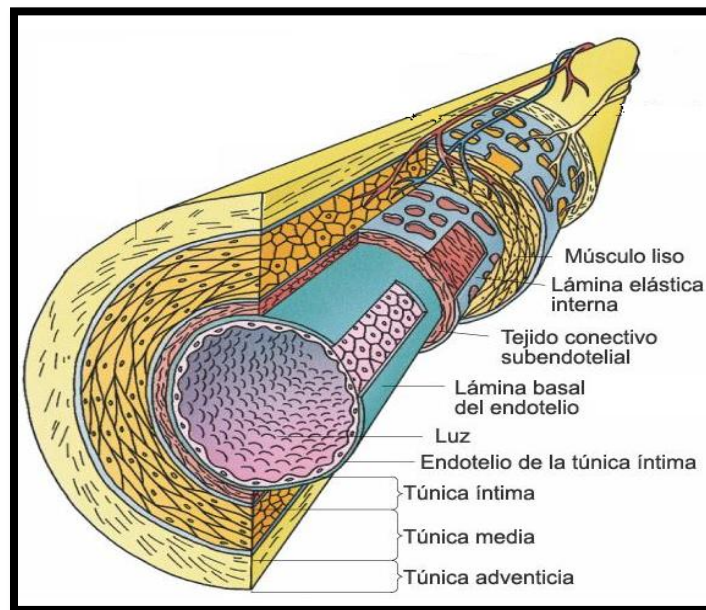


Figura 1. Composición de los vasos sanguíneos. En la figura se observa un corte transversal de la pared de un vaso sanguíneo. La capa media contiene fibras musculares lisas que se contraen para dilatar o para constreñir el tamaño del vaso. Estos pequeños cambios en el lumen o luz del vaso pueden influir mucho en la presión sanguínea y en el flujo sanguíneo. Tomado y modificado de <http://morfoudec.blogspot.com/2008/07/microscopa-virtual-vasos.html>.

Tal y como se mencionó anteriormente, existen tres tipos de vasos sanguíneos: arterias, venas y capilares. Las arterias transportan grandes caudales de sangre y a su vez, soportan importantes cambios cíclicos en el volumen de sangre que transportan y su componente más abundante es el tejido muscular. Las venas presentan paredes delgadas y poco elásticas que recogen la sangre y la devuelven al corazón. Se localizan más superficialmente que las arterias. A lo largo de su recorrido, sobre todo en las extremidades inferiores, tienen válvulas que impiden el retroceso de la sangre. Finalmente, el más pequeño de los vasos sanguíneos lo constituyen los

capilares, los cuales se encuentran constituidos por una capa de células endoteliales extremadamente aplanadas, y su función principal es el intercambio de sustancias entre la luz del vaso y el intersticio celular de los tejidos. (Mckenzie, 1999).

Si en el sistema circulatorio ocurren daños endoteliales y vasculares que generen la interrupción prolongada del flujo de sangre, puede desencadenar la producción de la hipoxia y muerte por necrosis de las células y tejidos irrigados por los vasos sanguíneos. Para evitar esta pérdida de sangre actúa el mecanismo denominado hemostasia sanguínea, encargado de formar una barrera que ocluye el sitio del daño. Esta barrera es inicialmente formada por plaquetas y posteriormente estabilizada por el polímero fibrina durante el proceso de coagulación. Una vez reparada la lesión, la barrera es degradada, lo cual garantiza que el flujo sanguíneo se restablezca. Si esto no ocurre, el flujo de sangre hacia ciertos tejidos puede verse afectado disminuyendo su velocidad, provocando isquemias, muerte del tejido, ataques cardíacos o infartos cerebrales (Mckenzie, 1999; Rasche, 2001).

III.2 Hemostasia sanguínea.

La Hemostasia sanguínea es el conjunto de mecanismos fisiológicos que detienen el sangrado y logran la preservación de la integridad del sistema circulatorio, al ocluir provisionalmente el sitio de la herida, generando un coágulo o trombo e iniciar posteriormente la reparación del tejido y posteriormente disolución del sello. La primera respuesta al ocurrir una lesión es la vasoconstricción del vaso sanguíneo, lo que genera la reducción al mínimo del flujo sanguíneo en el área lesionada y evita el menor escape de ésta en el sitio de la herida. Este mecanismo ocurre inmediatamente y presenta un tiempo corto de duración. En contraste, las

células endoteliales generan la vasodilatación del vaso, aumentando el suministro sanguíneo en el área lesionada y produciendo un enrojecimiento de la piel. La hemostasia se divide en distintas etapas: hemostasia primaria, donde ocurre la formación del tapón plaquetario; hemostasia secundaria, en la cual ocurre la formación del coágulo de fibrina y por último, la etapa de fibrinólisis, en la cual se genera la degradación del coágulo (Furie, 2009; Mckenzie, 1999; Verhamme y col., 2009;).

III.2.1 Hemostasia primaria.

Una vez ocurrida una lesión en un vaso sanguíneo, para detener la salida de sangre, las plaquetas se adhieren a las fibras de colágeno subyacente del endotelio expuesto. Estas células sin núcleo reaccionan para formar el tapón de plaquetas hemostático primario. La adhesión de las plaquetas a las fibras de colágeno desencadena una serie de cambios morfológicos y funcionales conocido como activación. Después de este proceso, el tapón hemostático primario continúa en una fase conocida como agregación, en la cual ocurre la adhesión de las plaquetas entre sí. Este tapón es frágil y se desprende fácilmente de la pared vascular, por lo que es necesario la deposición de los polímeros de fibrina, haciéndolo más fuerte y estable (Mckenzie, 1999).

La formación de este tapón requiere la sincronización de una serie de eventos: la creación de una monocapa de células activadas y el reclutamiento y la activación adicional de las plaquetas a través de la liberación de los agonistas plaquetarios (Franchini y Mannuccio, 2009). Paralelamente a este proceso ocurre la hemostasia secundaria.

III.2.2 Hemostasia secundaria o coagulación sanguínea

La hemostasia secundaria se produce casi simultáneamente a la formación del tapón plaquetario y ocurre sobre las membranas fosfolipídicas de la superficie celular del tejido sub-endotelial expuesto, cuando el endotelio vascular se lesiona, así como por las plaquetas que han sido activadas. Esta etapa se inicia cuando las proteínas plasmáticas solubles, denominadas factores de coagulación, interactúan de manera compleja para convertir la proteína fibrinógeno en fibrina insoluble. Estas proteínas se sintetizan en el hígado y se encuentran inactivas y circulantes en el plasma (zimógeno). Se han designado con números romanos del I al XIII, de acuerdo al orden de descubrimiento y no de la secuencia de reacción. Todas las enzimas de la cascada, con excepción del factor XIII (una transaminasa) son proteasas que escinden un residuo de serina en su sustrato específico. En la tabla 1 se muestra la nomenclatura internacional de los factores. La activación ocurre cuando los zimógenos se exponen a las capas sub-endoteliales de los vasos (Mckenzie, 1999).

Tabla 1. Nomenclatura de los factores de coagulación

Factor	Nombre
I	Fibrinógeno
II	Protrombina
III	Factor tisular (FT)
IV	Calcio iónico
V	Proacelerina o Factor de Leiden
VII	Proconvertina
VIII	Factor antihemolítico (FAH)
IX	Componente tromboplastínico del plasma (CTP)
X	Factor Stuart
XI	Factor antihemofílico C
XII	Factor de Hageman
XIII	Factor estabilizante de la fibrina

Tomado y modificado de Mckenzie 1999

Los factores pueden dividirse en tres grupos según sus propiedades bioquímicas: el primer grupo está constituido por los factores dependientes de la vitamina K, dentro de los cuales

se encuentran el factor II, VII, IX y X, los cuales requieren de calcio (Ca^{2+}) para enlazarse a la superficie fosfolípida; el segundo grupo conformado por los factores de contacto, que requiere del contacto con una superficie cargada negativamente para su actividad, entre los cuales se incluye los factores XI y XII; y el tercer grupo representado por los factores sensibles a la trombina, grupo conformado por los factores V, VII, XIII y fibrinógeno (Mckenzie, 1999).

Existen dos modelos para explicar el proceso de la coagulación sanguínea, el modelo de cascada y el modelo celular.

III.2.2.1 Modelo de Cascada de la Coagulación sanguínea

El modelo de cascada de la coagulación fue propuesto inicialmente en 1960, por Macfarlane y Ratnoff, el cual se fundamenta en una “cascada” de activación enzimática compuesta por una serie de etapas secuenciales, en las que la activación de un factor de coagulación permite la activación del siguiente, para finalmente favorecer la generación de la enzima trombina, que convierte una proteína soluble del plasma, el fibrinógeno, en una proteína insoluble, la fibrina, componente estructural del coágulo. Este modelo de cascada está dividido en tres vías, la vía extrínseca, la vía intrínseca, y la vía común (Figura 2), las cuales están basadas en el modo y la secuencia de activación *in vitro* de las proteínas de coagulación. Cada vía incluye un grupo específico de factores de coagulación. La vía intrínseca se activa por el contacto de las proteínas con superficies del endotelio vascular. El factor XII (FXII) es el primero en enlazarse a la superficie y por una escisión proteolítica se convierte en factor XII activado (FXIIa), generando una serie de reacciones en cascada para lograr la activación del factor X (FXa). A su vez la vía extrínseca es activada por el contacto con el factor VII (FVII) y el factor tisular (FT), proteína integral de membrana de 45 kDa, la cual se ubica en sitios

extravasculares, los cuales usualmente no están expuestos a la sangre, logrando la activación del FX. Tanto la vía intrínseca como la vía extrínseca convergen en una vía común que comienza con la activación del FX, generándose la degradación del fibrinógeno a fibrina, principal componente estructural del coágulo de sangre por la trombina. Además, este modelo indica que el rol de las células en el proceso se basa especialmente en aportar los fosfolípidos aniónicos necesarios para el ensamble de los complejos de coagulación (Hoffman y Monroe, 2001; Mckenzie, 1999; Páramo y col., 2009)

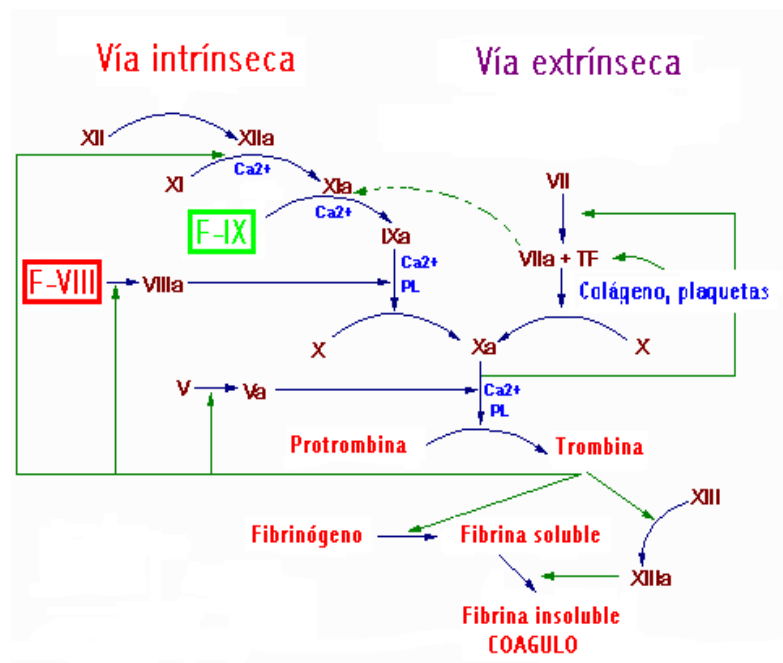


Figura 2. Vías que conforman el Modelo de Cascada de Coagulación. En la figura se observa la ruta extrínseca, la cual inicia con la activación del factor XII de la coagulación, formando el factor XII activado. Además se distingue la ruta extrínseca, la cual inicia con la activación del factor VII de la coagulación debido al factor tisular (FT). Estas dos rutas convergen en la activación de grandes cantidades de protrombina, generando la formación de trombina, proteína necesaria en la conversión del fibrinógeno en fibrina, inicialmente soluble, la cual polimeriza de manera inmediata por la agregación terminal-terminal, produciendo el polímero de fibrina insoluble. Tomado de <http://www.biologia.org/revista/fotos/numero16/Image77.gif>.

Debido a las limitaciones del modelo de cascada de coagulación como una propuesta para explicar el proceso hemostático, así como la comprobación que las vías que lo conforman no operan de forma independiente, ya que se reportó que el complejo FT/VII no sólo activa el FX

sino también el factor IX (FIX), se generó una nueva propuesta para lograr explicar el proceso fisiológico (Páramo y col., 2009).

En estudios más recientes, se demostró la importancia del componente celular en el proceso de coagulación, ya que tanto las plaquetas como las células portadoras del FT presentan diferentes propiedades relacionadas con el proceso de coagulación. Esto resulta de la expresión de una variedad de rasgos celulares, incluyendo receptores proteicos que localizan distintas estructuras del sistema de coagulación en superficie celulares específicas, y por ello se desarrolló el denominado modelo de celular de la coagulación, el cual refleja el proceso fisiológico *in vivo* (Hoffman y Monroe, 2001).

III.2.2.2 Modelo celular de la coagulación

El modelo celular de la coagulación se enfoca en las superficies celulares de las plaquetas y las células portadoras del FT, así como en los receptores específicos para los factores de la coagulación en estos tipos de células. El FT es el co-factor esencial para el inicio de la coagulación sanguínea, el cual es constitutivamente expresado en los fibroblastos en el músculo liso, en este último está presente en las capas externas, pero está ausente en las células sanguíneas y en las endoteliales que bordean las paredes de los vasos sanguíneos. Las superficies celulares de las plaquetas y las células portadoras del FT permanecen separadas hasta ocurrir una lesión, generando la activación del mecanismo (Monroe y Hoffman, 2006). Como se mencionó anteriormente, este modelo se fundamenta en el entendimiento del proceso *in vivo* y está dividido en distintas fases solapadas denominadas: iniciación, amplificación y propagación.

Iniciación

La fase de iniciación del proceso de coagulación ocurre en las células portadoras del FT. Cuando ocurre una lesión en el vaso sanguíneo, el FVII ubicado en el plasma se une al FT y es activado por proteasas procoagulantes, así como anticoagulantes, generándose el complejo FVII/FT, el cual activa cantidades reducidas de los factores X y IX. Además, esta unión en la superficie celular moviliza al FT proveniente del aparato de Golgi, el cual se está transportando al exterior de la superficie celular de la membrana plasmática. En la Figura 3 se puede observar el modelo que muestra la asociación de éstas dos proteínas así como la activación de los dos factores mencionados anteriormente (Monroe y Hoffman, 2006; Pendurthi y Mohan Rao, 2008).

El FXa se asocia con el FVa para formar el complejo FVa/FXa en la superficie de esta célula. Este complejo genera pequeñas cantidades de trombina. Por otra parte, el FXa localizado fuera de la superficie de las células portadores del FT, es inhibido rápidamente tanto por la antitrombina tres (AT-III) así como por el inhibidor de la vía FT (TFPI) (Monroe y Hoffman, 2006)

Amplificación

La amplificación es la segunda fase del proceso. En esta etapa, la lesión logra que las plaquetas tengan contacto con el tejido extravascular, lo que les permite adherirse a las fibras de colágeno y a otros componentes de la matriz extracelular hacia el lado de la herida, así como la proximidad con las células portadoras de FT (Figura 3). El proceso de adhesión plaquetaria activa parcialmente a estas células y promueve la secreción del FV parcialmente activado proveniente de gránulos alfa de estas células. El FV (zimógeno) también puede ser activado por el FXa o por proteasa procoagulantes. Además, la reducida cantidad de trombina generada en la

fase de iniciación amplifica la señal procoagulante, al incrementar la adhesión de las plaquetas, activando totalmente estas células así como al FV, el FVIII y FXI (Hoffman y Monroe, 2001).

Propagación

La fase de propagación es la última fase del proceso y ocurre en las plaquetas. Durante esta fase, el FIXa proveniente de las células portadoras del FT, puede difundir hacia las plaquetas y asociarse con el FVIIIa (Figura 3) en la superficie de las mismas, además este factor no es inhibido por el TFPI y es inhibido ligeramente por la AT-III. A su vez, el FIXa también puede producirse en la superficie plaquetaria por su activación por el FXIa. Una vez generado el complejo FIXa/FVIIIa se produce la activación del FX, el cual se asocia con el FVa para formar el complejo FVa/FXa, el cual convierte grandes cantidades de protrombina a trombina, resultando el clivaje proteolítico del fibrinógeno a monómeros de fibrina, la cual polimeriza y así le genera estabilidad al tapón plaquetario (Hoffman, 2003).

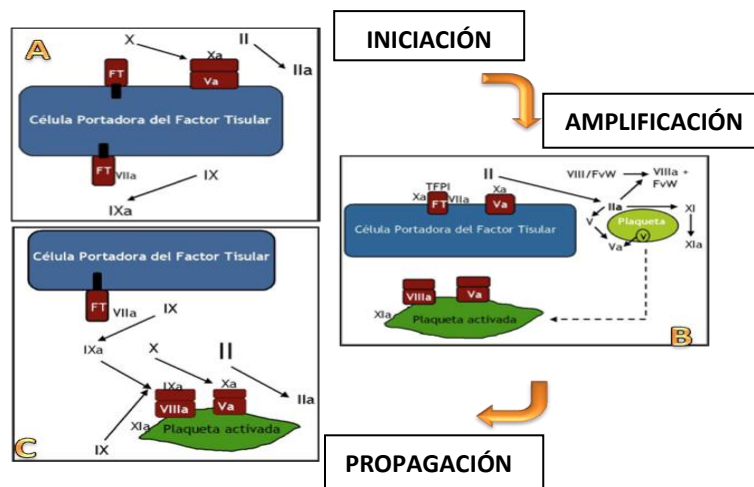


Figura 3. Fases del modelo celular de la coagulación. En la figura se puede distinguir la primera etapa del proceso (iniciación, A), en la cual ocurre la unión del factor tisular (FT) y el factor VII de la coagulación, este complejo genera la activación del factor X y el factor XI de la coagulación, generando la activación del factor V y como consecuencia la formación de trombina. Además se aprecia la segunda etapa (amplificación, B), en la cual las plaquetas se adhieren a la matriz extracelular y ocurre la activación de los factores V, VIII y XI en la superficie plaquetaria. En la tercera fase (propagación, C) ocurre la activación del factor X por parte del complejo VIIIa/IXa así como la formación de grandes cantidades de trombina en la superficie plaquetaria necesaria para la conversión del fibrinógeno en fibrina. Tomado de Páramo y col., 2009.

III.3 Fibrinólisis

La fibrinólisis es un mecanismo esencial para eliminar los coágulos de fibrina durante el proceso de cicatrización (Páramo y col., 2009). Este sistema se activa en respuesta al inicio del proceso de coagulación y produce una enzima proteolítica denominada plasmina, que tiene la capacidad de digerir tanto la fibrina como el fibrinógeno. La plasmina (Pn) deriva de su zimógeno el plasminógeno (Pg), el cual es una globulina β , glucoproteína que se sintetiza en el hígado y está compuesta por cinco subunidades idénticas de tres bucles cada una, denominadas kringles (K). La primera (K1) de estas estructuras sirve de unión de alta afinidad a la lisina, y estos dominios de unión a lisina del Pg parecen mediar sus interacciones específicas con la fibrina, los receptores de la superficie celular y con su inhibidor la α 2-antiplasmina (α 2-AP). La Pn es una enzima que se forma a partir de la acción de varios activadores, los cuales pueden encontrarse en la sangre (intrínsecos), en muchos otros tejidos (extrínsecos) o pueden ser de carácter exógeno, generando la escisión de un puente peptídico Arg-Val en la posición 560-561 en la proteína Pg (Mckenzie, 1999 ; Hajjar, 2002). Entre los activadores que existen, algunos de ellos son: el activador tisular (t-PA), glicoproteína sintetizada y secretada principalmente por las células endoteliales, incrementándose su afinidad por el Pg más de 1000 veces en presencia de fibrina; y el activador tipo urocinasa (u-PA), la cual también es una glicoproteína . La regulación tiene lugar por la acción de inhibidores (PAI), de los cuales el más relevante es el PAI-1, una glicoproteína de cadena única liberada por células endoteliales, monocitos, macrófagos y plaquetas; mientras que la Pn circulante es rápidamente inhibida por la α 2-AP, glicoproteína que bloquea tanto los sitios de enlace de lisina, mencionados anteriormente, como el sitio activo de la Pn (Elhasade y col., 1998) (Figura 4).

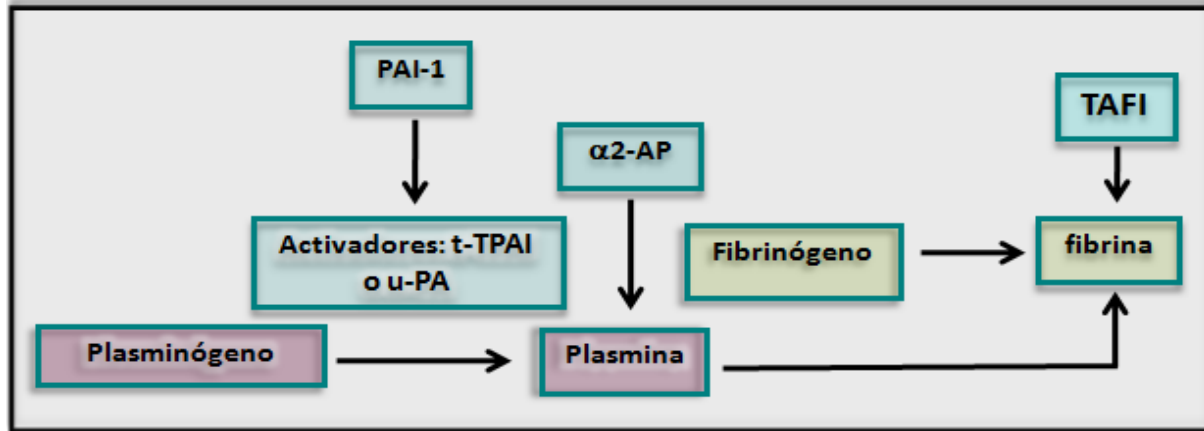


Figura 4. Esquema del funcionamiento del sistema fibrinolítico. Se puede apreciar la formación del plasminógeno en plasmina, proteína que genera la degradación de la fibrina a través de la acción de diferentes activadores, los cuales son regulados por la acción de inhibidores como PAI-1. A su vez la plasmina puede ser inhibida por la acción de α_2 -antiplasmina (α_2 -AP).

La fibrinólisis inhibe la formación de fibrina mediante la AT-III y el sistema de la proteína C-proteína-S, que inhibe a los factores activados de la coagulación (Martinez, Murillo y Quintanilla, 1996).

Como se aprecia en lo descrito anteriormente, bajo condiciones fisiológicas, existe un delicado balance entre el sistema procoagulante y anticoagulante, logrando asegurar una efectiva hemostasia en lesiones vasculares. Cualquier alteración de este balance puede resultar en el desarrollo de eventos hemorrágicos o trombóticos y el flujo de sangre hacia distintos tejidos puede verse afectado, disminuyendo su velocidad, provocando isquemias, muerte del tejido, ataques cardíacos o infartos cerebrales (Mckenzie, 1999; Franchini y Mannucci, 2009).

III.4 Trombosis.

La trombosis, de especial interés en este trabajo, ocurre cuando el sistema hemostático se activa de manera inapropiada, los procesos procoagulantes se superan, permitiendo la formación de un coágulo o trombo dentro de un vaso sanguíneo sin lesión. Pueden bloquear de forma parcial o total la luz de un vaso sanguíneo, así como puede ocurrir la migración de una porción del trombo, llamada émbolo y desplazarse hacia ramas vasculares más pequeñas, alojándose en

otros vasos sanguíneos, produciendo la obstrucción del flujo sanguíneo causando la muerte del tejido. Esta obstrucción se denomina tromboembolismo (Mckenzie, 1999). El trombo puede producirse en cualquier parte del sistema circulatorio, de tal manera que puede localizarse tanto en arterias como en venas, generando la obstrucción del flujo sanguíneo y como consecuencias causar isquemia (falta de oxígeno), resultando en la producción de una lesión en las células que puede evolucionar hacia la muerte celular. Por lo tanto la trombosis puede dividirse en trombosis arterial o trombosis venosa (Martínez-Murillo y Quintana, 1996).

III.4.1 Trombosis arterial

Los trombos arteriales se producen en vasos sanguíneos en los cuales el flujo es rápido y presentan una presión considerable. Estos trombos son de color blanco debido a su composición, ya que la formación del coágulo inicia por la interacción del endotelio lesionado y las plaquetas y al estar constituido principalmente por capas de plaquetas y fibrina, lo que da un aspecto de “trombo blanco” entre las cuales pueden quedar atrapados leucocitos y eritrocitos (Mckenzie, 1999).

La trombosis arterial puede ocurrir como consecuencia de la ruptura de una placa aterosclerótica, la cual se forma mediante un proceso complejo que implica diferentes tipos de células, como las células endoteliales, las células musculares lisas vasculares, los macrófagos y los linfocitos, así como numerosas familias de citocinas y factores de crecimiento. La ruptura de una placa de ateroma provoca una lesión en la pared del vaso, y se exponen varias proteínas de la matriz subendotelial, como el colágeno, lo que genera el depósito de plaquetas, que aumenta debido a la estimulación de la coagulación, conllevando a la formación de trombina, produciendo mayor actividad plaquetaria y más formación de trombina (Figura 5) (Endler y Mannhalter,

2003). La ubicación más frecuente de la trombosis arterial es en las arterias coronarias, los vasos que irrigan y nutren al corazón, de manera que si se produce un trombo a este nivel, se obstaculiza el flujo sanguíneo y la oxigenación del músculo cardíaco, lo cual trae como consecuencia que se produzca una angina de pecho (bloqueo de oxigenación de una zona del corazón sin muerte del tejido cardíaco) o un infarto de miocardio, que es la cardiopatía isquemia más representativa, en la cual el bloqueo de la oxigenación del músculo cardíaco es permanente provocando su muerte en una zona particular. Además, este tipo de trombosis puede ocurrir en arterias cerebrales originando el accidente cerebro vascular (ACV), ocasionando la disminución del flujo sanguíneo, dando como resultado isquemia en el tejido cerebral y falta de glucosa necesaria para un adecuado metabolismo cerebral, lo que genera inestabilidad en los potenciales de membrana, la síntesis y liberación de neurotransmisores, ocasionando déficit neurológico (Taroco y col., 2009; Collados, 2002).

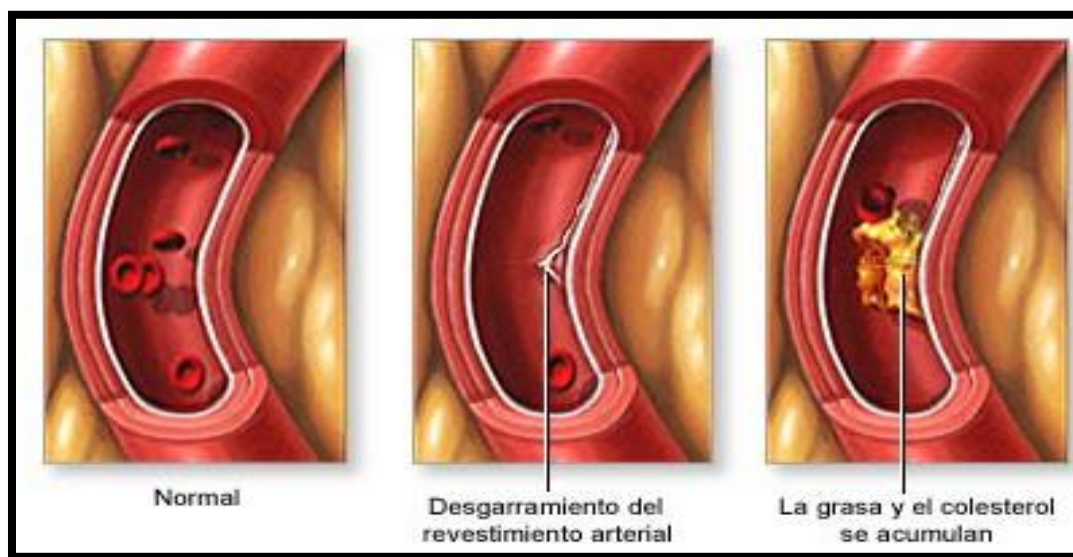


Figura 5. Evolución de la acumulación de placa de ateroma. Se observa la obstrucción producida por la presencia de placas de ateroma resultantes de la inflamación crónica y del depósito de colesterol, lo que genera la aterosclerosis o dureza y engrosamiento anormal de las paredes de las arterias. Tomado y modificado de http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/1803.htm.

III.4.2 Trombosis venosa

La trombosis venosa ocurre en vasos sanguíneos que presentan flujo lento, generalmente en los repliegues y cúspides valvulares, debido a que en estos sitios la velocidad de la sangre es menor y la corriente local presenta rotaciones elipsoidales y casi estáticas, lo cual favorece que se encuentren más factores de coagulación sobre el endotelio (Figura 6) (Lane y Grant, 2000). La lesión al endotelio no es tan evidente, generando la contracción de las células y como consecuencia la producción de brechas. Las plaquetas llenan el espacio para adherirse al endotelio expuesto para activarse, esta reacción puede generar la producción de fibrina. El trombo venoso es de color rojo debido a que los eritrocitos quedan atrapados entre la red de plaquetas y fibrina cuando el flujo es lento (Mckenzie, 1999). Después que el trombo se asienta sobre el seno valvular las corrientes de flujo cambian localmente, disminuye el área de la vena, se produce estenosis y mayor fuerza de rozamiento, lo cual disminuye la velocidad distal (caudal) y permite el crecimiento del trombo (Lane y Grant, 2000). La trombosis venosa clínicamente significativa se denomina trombosis venosa profunda (TVP) y ocurre en las venas profundas del cuerpo. La TVP puede formarse en las venas de las pantorrillas así como en las venas de los miembros inferiores. Al producirse la TVP se disminuye el retorno venoso de la extremidad, con acumulación de líquido y aumento de la presión en el espacio intersticial, como consecuencia se produce edema, además, la misma hipertensión venosa produce dilatación de las venas, además ocurre la mayor extracción de oxígeno de los tejidos, y se produce la cianosis. Las complicaciones principales de la trombosis venosa profunda son las embolias o coágulo procedente del sistema venoso. Los émbolos producidos en las venas profundas en los miembros inferiores se desplazan a través de venas cada vez más grandes hasta el lado derecho del corazón

y finalmente alcanzan la circulación pulmonar y ocluyen los vasos en los pulmones causando tromboembolismo pulmonar (TEP) (Mackenzie, 1999).

La trombosis, ya sea arterial o venosa, es considerada una enfermedad de origen multifactorial, ya que puede ser el resultado de la exposición a distintos factores de riesgo, los cuales son características genéticas, fisiológicas, del comportamiento y socioeconómicas de los individuos, que les sitúan dentro de una cohorte de la población en la que es más probable el desarrollo de una enfermedad. Los factores de riesgo son características individuales que influyen sobre las probabilidades de un individuo de sufrir este tipo de patologías.

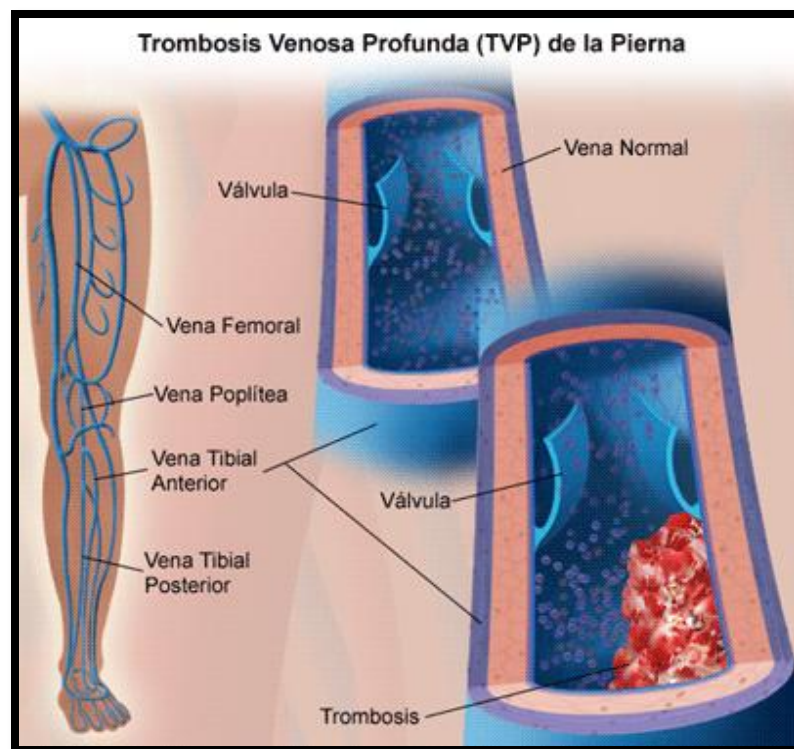


Figura 6. Trombosis Venosa Profunda. Se observa la obstrucción del vaso sanguíneo por la presencia de un trombo generalmente cerca de las válvulas, debido a que la circulación es muy lenta. Las venas gemelares y las sóleas son los sitios en donde con mayor frecuencia se origina la TVP. Allí el endotelio posee menor cantidad de fibrinolíticos y es el lugar de menor velocidad de la sangre. Tomado de <http://trabajolibre.files.wordpress.com/2010/05/tvp.gif>.

III.5 Factores de riesgo

Existen diversos factores que aumentan la probabilidad de producción de trombosis. En relación a la trombosis arterial, entre los factores de riesgo se incluyen las dietas ricas en colesterol, el tabaquismo, el uso de anticonceptivos, presencia de ciertas patologías como aterosclerosis, hipertensión, diabetes y síndrome nefrótico. Se han realizado diversos estudios para determinar si la prevalencia de los factores de riesgo presentan patrones similares en diferentes países alrededor del mundo (América del Norte, Latinoamérica, Europa Oriental y Occidental, Asia, Australia y Japón). Estos estudios permitieron concluir que la totalidad de los pacientes aterotrombóticos observados presentaban hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes, hábito tabáquico y obesidad; factores que contribuyen con el riesgo a desarrollar aterotrombosis (Bhatt y col., 2006).

Para la trombosis venosa, la obesidad y la deficiencia de inhibidores naturales de la coagulación, así como la presencia de várices, han sido asociadas al desarrollo de la patología. Además existen algunas conductas de riesgo que estimulan la formación de este tipo de trombosis, entre ellas se incluyen permanecer sentado períodos prolongados, sentarse con las piernas cruzadas o usar prendas apretadas (Mckenzie, 1999). Se produce un aumento en el riesgo de desarrollar TVP en el caso de conductas, enfermedades y estados que causan estasis sanguínea, siendo más frecuente en personas sedentarias y obesas, en pacientes con enfermedades graves, traumatismos o postoperatorios, además del ingreso de procoagulantes a la circulación (Mckenzie, 1999; Benítez y col., 2004). Adicionalmente, existen otros factores que aumentan el riesgo de sufrir este tipo de patologías, entre ellas las fracturas, el cáncer, la producción excesiva de glóbulos rojos y el embarazo, además las de origen genético.

III.5.1 Factores genéticos

Existen factores genéticos que están asociados a la hipercoagulabilidad, dado que ocurren mutaciones en la secuencia de genes que provocan alteraciones funcionales en moléculas implicadas en la coagulación. Estas alteraciones son capaces de generar una predisposición, en la persona que los porta, a padecer trombosis en cualquier etapa de la vida y en ausencia de estímulos adquiridos (Collados, 2002). La importancia de los factores hereditarios o genéticos es demostrada por el hecho que entre el 20% y 40% de los pacientes poseen antecedentes familiares de la enfermedad (Lens y col., 2000). Entre las variaciones en la secuencia de los genes pueden encontrarse los polimorfismos genéticos, que se caracterizan por la coexistencia de dos variedades o alelos del mismo gen, y el menos frecuente debe estar en más del 1% de la población (Navarro y López, 2002).

Varias evidencias experimentales han sugerido en las últimas décadas la importancia de los factores de riesgo genéticos, relacionados principalmente con el sistema hemostático que influyen en el riesgo trombótico. Se han identificado variantes genéticas en los genes que codifican para las proteínas relacionadas con los sistemas de coagulación, fibrinólisis, receptores plaquetarios, disfunción endotelial, flujo sanguíneo anormal, metabolismo de la homocisteína y estrés oxidativo, los cuales se asocian al desarrollo de patologías trombóticas. En las últimas décadas se ha logrado reportar numerosos polimorfismos genéticos, cuyos alelos de riesgo se han sugerido como factores de riesgo en algunas poblaciones (Salas y col., 2010; Hahn y col., 2004).

Entre estos genes se encuentra el gen que codifica para el factor VII de la coagulación, de especial interés en este trabajo.

III.6 Factor VII de la coagulación

El gen que codifica para el factor VII presenta una longitud de 12,8 kpb (Shanker y col., 2009), contiene 9 exones y 8 intrones y se ubica en el brazo largo del cromosoma 13 (13q34) (Nour y col., 2005). En el RNA del factor VII ocurre *splicing* alternativo, evento que puede generar dos variantes de la proteína; una variante contiene un exón de 66 pb y la otra variante que no lo presenta. En ambos casos generan un transcrito que codifica para proteínas biológicamente activas (Figura 7). Además presenta 5 regiones de repeticiones en toda en todo el gen (O' Hara y col., 1987)

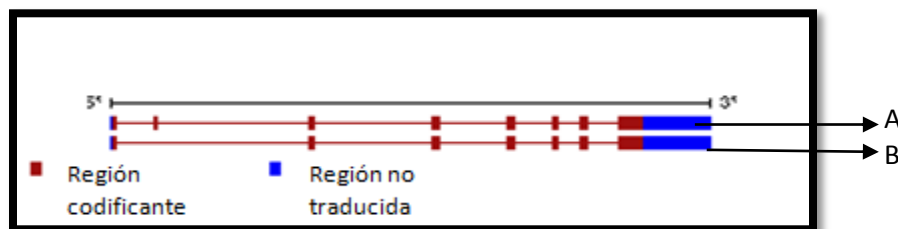


Figura 7. Representación gráfica de las regiones del gen del FVII. En la figura se observan dos variantes que representan distintas isoformas del FVII, así como los exones, identificados por los cuadros de color vinotinto y los intrones, indentificados por la línea vinotinto. La primera variante (A) contiene un exón opcional que genera un péptido más largo. La segunda variante (B) no incluye el exón anteriormente mencionado. Tomado y modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Además la línea verde que se observa indica la direccionalidad del gen

El factor FVII de la coagulación es una glicoproteína de una sola cadena polipeptídica de 406 aminoácidos, con una masa molecular aproximada de 50 kDa, se sintetiza en el hígado y su concentración plasmática es aproximadamente 500 ng/ml. La síntesis de esta proteína es dependiente de vitamina K y se transforma a su forma activa (FVIIa) en presencia del FT y moléculas ligando, como el ión Ca^{+2} .

La activación ocurre mediante la fragmentación de la cadena polipeptídica de la proteína, debido a una proteólisis entre el aminoácido arginina en la posición 152 y el aminoácido isoleucina en la posición 153, resultando la formación de dos cadenas. Una cadena ligera de 152

aminoácidos, proveniente de la región amino terminal de la proteína, que contiene 10 residuos de ácido glutámico, sitios probables de carboxilación, y que constituyen el dominio Gla o carboxiglutamato, el cual se encarga de la unión del factor a la superficie de la membrana. Este dominio se encuentra localizado de manera análoga en otras proteínas dependientes de vitamina K y están involucrados en la unión de iones calcio. Además, en esta misma cadena se encuentran presentes dos dominios de factor de crecimiento epidérmico (EGF). La cadena pesada de 254 aminoácidos, proveniente de la región carboxi- terminal de la proteína, es la que contiene la región catalítica del factor. Estas dos cadenas se encuentran unidas por dos puentes disulfuro (Hagen y col., 1986) (Figura 8).

Una vez activa, se une al FT en la superficie celular e inicia el proceso de coagulación. Además, induce la señalización intracelular, la cual depende de receptores activados de proteasas específicas (PAR, por sus siglas en inglés) en la superficie celular (Pendurthi y Mohan Rao, 2008).

El FVII presenta una vida media de 3 a 5 horas y la variante activa permanece en la circulación el mismo tiempo que el zimógeno (Mckenzie, 1999). El principal inhibidor del complejo es el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), asegurando que los pequeños estímulos pro-coagulantes no generen una cantidad descontrolada de trombina (Pendurthi y Mohan Rao, 2008).

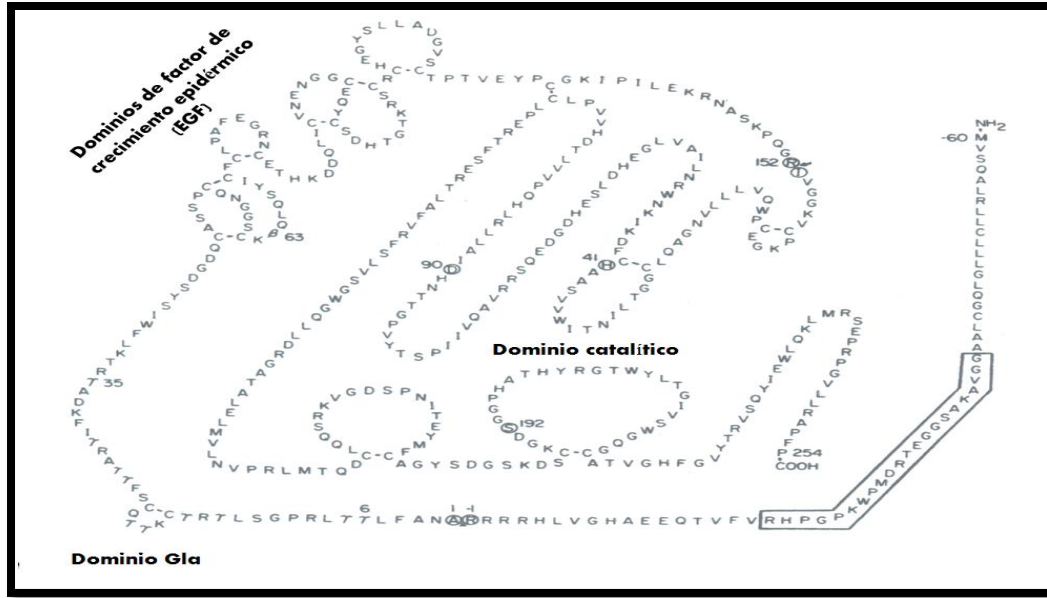


Figura 8. Secuencia de aminoácidos y estructura tentativa de la proteína factor VII. La secuencia de 60 aminoácidos (numerada en la figura desde el número -60 al número -1) es removido en la biosíntesis por un péptido señal y se genera una proteólisis entre el enlace del aminoácido arginina e isoleucina ubicada en la posición -1 y 1. Se observa el lugar donde ocurre la proteólisis que genera la activación de la proteína señalada con una flecha. En la cadena ligera se ubica el dominio Gla y los dominios de factor de crecimiento epidérmico y en la cadena pesada, la cual se señala con el número 254 presenta el dominio catalítico, Los tres principales aminoácidos señalados en círculo son los que participan en la catálisis. Tomado y modificado de Hagen y col., 1986.

Diversos estudios han determinado la contribución genética en la variación de los niveles de FVII en el plasma. Se han reportado diversos polimorfismos en el gen que codifica para el factor FVII de la coagulación, de los cuales algunos genotipos se han implicado en la variación de los niveles plasmáticos de la proteína en su forma activa. Algunos polimorfismos se ubican en la región promotora y se encuentran asociados con el transcrito y la abundancia de la proteína *in vivo*. Esto indica que la mayor frecuencia observada es una combinación particular de mutaciones, por lo cual la magnitud del efecto de cada una de ellas aún no ha sido clarificada. Por otra parte, en varios estudios se han reportado que el resultado de la presencia de estas mutaciones, es la reducción de la expresión de la proteína. Un polimorfismo cuyo genotipo ha sido relacionado con la modulación de los niveles plasmáticos del FVII, se encuentra ubicado en

la región intrónica, específicamente en el intrón 7, y se caracteriza por variaciones en las secuencias repetidas que se ubican en este intrón (Pinotti y col., 2000).

Además de los polimorfismos ubicados en la región promotora e intrónica, existe otro ubicado en la región codificante y se ha relacionado con la variación de los niveles plasmáticos de la proteína de forma activa (Hahn y col., 2004). Este último se caracteriza por el cambio de una sola base (SNP) en la posición 10976 del gen, ubicado específicamente en el exón 8, región que codifica para la porción catalítica del FVII (Figura 9) y ha sido el mayor determinante de la variación de los niveles de dicho factor activo en el plasma en la población. El cambio polimórfico sustituye el nucleótido guanina por el nucleótido adenina (g.10976 G>A) y provoca el cambio del aminoácido arginina (R) por el aminoácido glutamina (Q) en la posición 353 de la proteína (R353Q) (Iacoviello y col., 1998; Nour, y col., 2005; Mtiraoui y col., 2005; Shanker y col., 2009).

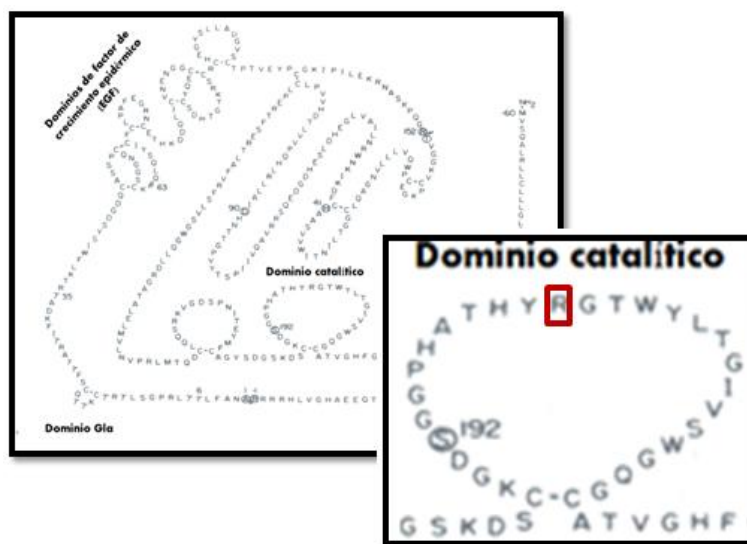


Figura 9. Dominio catalítico de la proteína factor VII de la coagulación. En la figura se observa el dominio catalítico de la proteína ubicado en la cadena pesada, además se denota en cuadro rojo el residuo 353, representado por el aminoácido arginina, codificado por el codón CGG, donde se ubica el polimorfismo g.10976 G>A, específicamente la segunda guanina del codón. Tomado y modificado de Hagen y col., 1986.

Iacoviello y colaboradores (1998) realizaron un estudio con el objetivo de correlacionar si determinados alelos de algunos polimorfismos genéticos, entre ellos el alelo A del polimorfismo g.10976 G>A en el gen que codifica para el factor VII de la coagulación, están asociados con los niveles plasmáticos activos de la proteína y si la presencia de dicho alelo aumenta el riesgo de padecer infarto al miocardio (IM). En dicho estudio utilizaron 165 individuos del sexo masculino, con edades comprendidas entre 55 y 59 años, con historia familiar de incidencia al infarto al miocardio y 225 individuos controles, entre 56 y 58 años, los cuales no presentaban incidencia personal, ni familiar, de infarto al miocardio. Estos investigadores determinaron que los pacientes con incidencia de infarto al miocardio presentan altos niveles de FVII activo en comparación con los individuos controles.

La substitución del aminoácido arginina por glutamina podría afectar la interacción del FVII con el FT, generando efectos en el estado activo de la molécula (van't Hooft y col., 1999). Este efecto podría deberse a cambios en la proteína, ya que el aminoácido arginina presenta grupos básicos en su cadena lateral y en condiciones fisiológicas se encuentran cargado positivamente, presentan gran polaridad, ubicándose generalmente en las superficies exteriores de las proteínas, y por el contrario, la glutamina presenta una cadena lateral sin carga, aunque polar (Mathews, 2002).

Girelli y colaboradores (2000) realizaron otro estudio con la finalidad de investigar si existe alguna asociación entre el genotipo del polimorfismo g.10976 G>A con el riesgo de padecer IM. Se ensayaron un total de 444 pacientes mayores de 60 años, de los cuales 311 presentaban arteriosclerosis coronaria y de ellos 175 habían padecido IM, y como grupo control emplearon 133 individuos con arteriogramas coronarios normales. Del análisis del polimorfismo

en esta población, los autores encontraron 107 individuos heterocigotos (G/A) y 10 individuos homocigotos para el alelo mutado (A/A). Estos autores determinaron que las frecuencias genotípicas de los pacientes con arterioesclerosis coronaria no difieren significativamente de la población control. Además, la prevalencia del alelo G en los individuos con enfermedades coronarias sugiere que el alelo A de este marcador genético puede conferir protección al infarto al miocardio.

Posteriormente Wu y Tsongalis en el año 2001, realizaron un estudio con la finalidad de conocer el papel de distintos genotipos de diferentes polimorfismos en genes que codifican para las proteínas involucradas en el proceso de coagulación, incluyendo el polimorfismo g. 10976 G>A, así como algunos polimorfismos ubicados en genes que codifican para factores plaquetarios, con el riesgo de padecer infarto agudo al miocardio. En dicho estudio se analizó una población total de 2574 individuos, dentro de la cual se incluyó tanto pacientes como individuos controles. Este análisis sugirió que el alelo 10976 A confería protección a desarrollar infarto agudo al miocardio.

Contrariamente, Funk y colaboradores (2006), cuando analizaron 242 individuos que padecieron accidente cerebro vascular, menores de 60 años, y 239 individuos controles, no encontraron asociación con ningún genotipo en particular del polimorfismo g.10976 G>A y por lo tanto, concluyeron que este polimorfismo no tiene influencia significativa para sufrir un ACV.

Maguire y colaboradores (2008) realizaron un estudio con la finalidad de relacionar algunos polimorfismos, ubicados tanto en el gen de la glicoproteína de las plaquetas como en el gen que codifica para el FVII de la coagulación, incluyendo el polimorfismo g.10976 G>A, con el riesgo de padecer ACV. Se analizaron de 1537 pacientes y 3133 individuos controles. Del

análisis realizado en la población, se reportó que la mutación de interés de este estudio no presenta ninguna asociación con la patología mencionada anteriormente.

En estudios realizados por otros investigadores, se ha tratado de correlacionar el alelo A del polimorfismo g.10976 G>A con patologías cardiovasculares (Mtiraoui y col., 2005; Taymaz y col., 2007; van't Hooft y col., 1999). Sin embargo no se ha reportado dicha asociación. Este resultado sugiere que las patologías trombóticas pueden estar indirectamente influenciadas por la presencia de otros factores de riesgo (Shanker y col., 2009). Sin embargo, en otro estudio se han encontrado diferencias significativas en las frecuencias genotípicas y en los niveles plasmáticos del FVII activo en distintos grupos étnicos (Moniek y col., 1997), lo que sugiere que el efecto del alelo A del polimorfismo 10976G>A, puede estar influenciado por la composición genética de los diferentes grupos étnicos (Nour y col., 2005).

III.7 Justificación

Las enfermedades cardiovasculares, en especial el IAM, son las principales causas de mortalidad a nivel mundial. En el año 2010 de la Organización Mundial de la Salud estimó que las enfermedades cardiovasculares fueron las causantes del 80% de mortalidad (Anad y col., 2009), representando un grave problema de salud pública y provocando extensa pérdida de seres humanos.

El FVII es una de las proteínas más importantes dentro de la hemostasia sanguínea, ya que inicia el proceso de coagulación. Esta enzima, como se dijo anteriormente se une al FT, proteína que no expone eficientemente su centro activo a menos que el FVII se enlace al FT. Una vez que ocurre esta unión, activan al factor X y al factor IX, con lo cual se generará una pequeña cantidad de trombina, ya que el factor X conlleva a la activación de la protrombina origina

pequeñas cantidades de trombina. Esta cantidad inicial de trombina va a ser muy importante, ya que es requerida para desencadenar la activación de otros factores y así lograr la producción del coágulo de fibrina. Es debido a esto que muchos trabajos se han enfocado en el estudio de la interacción de estas dos enzimas, así como las distintas mutaciones que generen un efecto en las proteínas que generen mayor eficiencia en esta unión, que conlleven o a la eficiencia de activación en alguna de ellas, lo cual genere la predisposición al desarrollo patológico de los coágulos de sangre.

Es conocido que la causa más común del IAM es la trombosis originada en la arteria coronaria por la ruptura de la placa aterosclerótica, un proceso conocido como aterotrombosis (Salas y col., 2010). Asimismo, ha sido reportado que el riesgo de sufrir trombosis incrementa si los niveles de los factores de la coagulación sanguínea están elevados (Chandler y col., 2002). Dicha elevación pudiera deberse, en parte, a la presencia de polimorfismos en los genes que los codifican (Endler y Mannhalter, 2003). Por su parte el ACV isquémico u oclusivo se debe sólo a una oclusión de alguna de las arterias que irrigan la masa encefálica, ya sea por acumulación de fibrina, calcio o alguna anomalía en los eritrocitos, pero generalmente es por aterosclerosis o bien por un émbolo que procede de otra localización, fundamentalmente el corazón u otras arterias. Por otro lado, la ocurrencia de una TVP puede generarse sin ningún tipo de síntomas, pero en muchos casos la extremidad afectada se volverá dolorosa, hinchada, roja, caliente y las venas superficiales pueden distenderse. La mayor complicación de una TVP es que puede ocurrir el desalojo del coágulo y viajar a los pulmones, causando una embolia pulmonar.

Por lo anteriormente expuesto, en el Laboratorio de Genética Molecular y Humana, de la Universidad Simón Bolívar, conjuntamente con la Unidad de Cardiología del Hospital Dr. Miguel Pérez Carreño y el Banco Municipal de Sangre de Caracas, se lleva a cabo un proyecto,

en el cual se está estudiando la asociación de los genotipos de diferentes polimorfismos en los genes que participan en la coagulación de la sangre con la trombosis arterial y venosa. Específicamente en este trabajo se investigará, por primera vez en Venezuela, si existe alguna relación entre el genotipo del polimorfismo g.10976 G>A en el FVII de la coagulación y el infarto agudo al miocardio, la trombosis venosa profunda y/o el accidente cerebro vascular. Así mismo, mediante este estudio se pretende determinar si estos polimorfismos son un factor de riesgo independiente, o si su efecto está correlacionado con la presencia de factores de riesgo adquiridos.

IV.METODOLOGÍA

IV.1 Selección de pacientes

La detección del polimorfismo g.10976G>A se realizó en pacientes que han sufrido infarto agudo al miocardio, trombosis venosa ó accidente cerebro vascular, así como en la población empleada como control.

El estudio comprendió un total de 103 pacientes sobrevivientes, que han sufrido IAM, que fueron diagnosticados mediante el incremento de la presencia de creatinina quinasa con CK-MB>10 % y la prueba del incremento de troponina I, típica alteración electrocardiográfica, junto con evidencia de síntomas clínicos; 100 pacientes que han sufrido TVP, diagnosticados por ultrasonido doppler o por angiografía y 69 pacientes que han sufrido ACV, diagnosticados por tomografía computarizada o por angiografía; 112 individuos controles (donantes de sangre) no relacionados y aparentemente sanos, sin historia personal o familiar de enfermedad cardiovascular.

IV.2 Obtención de muestra

La sangre periférica de todos los individuos fue recolectada mediante la técnica de venopunción en el período comprendido entre febrero 2005 y julio 2007, luego de obtenido el consentimiento de previa información (Anexo 1). La sangre fue tratada con EDTA (anticoagulante) y fue congelada para realizar posteriormente el aislamiento del ADN genómico y el plan de trabajo presentado en la Figura 10.

A cada uno de los individuos que participaron en el estudio se les colectaron datos correspondientes a edad, sexo, hábito tabáquico, presencia de hipertensión (definida como el uso de droga antihipertensiva o presencia de una presión sanguínea sistólica de, al menos, 140 mm Hg y/o una presión sanguínea diastólica de, al menos, 90 mm Hg) y presencia de diabetes mellitus (definida por niveles de glucosa en sangre de, al menos, 6,93 mmol/L) (anexo 1, Planilla de recolección de datos). Las muestras de sangre de los pacientes que han sufrido IAM fueron obtenidas en la Unidad de Cuidados Coronarios del “Hospital Dr. Miguel Pérez Carreño” (Caracas, Venezuela). Las muestras del grupo control, TVP y ACV fueron obtenidas del Banco Municipal de Sangre.

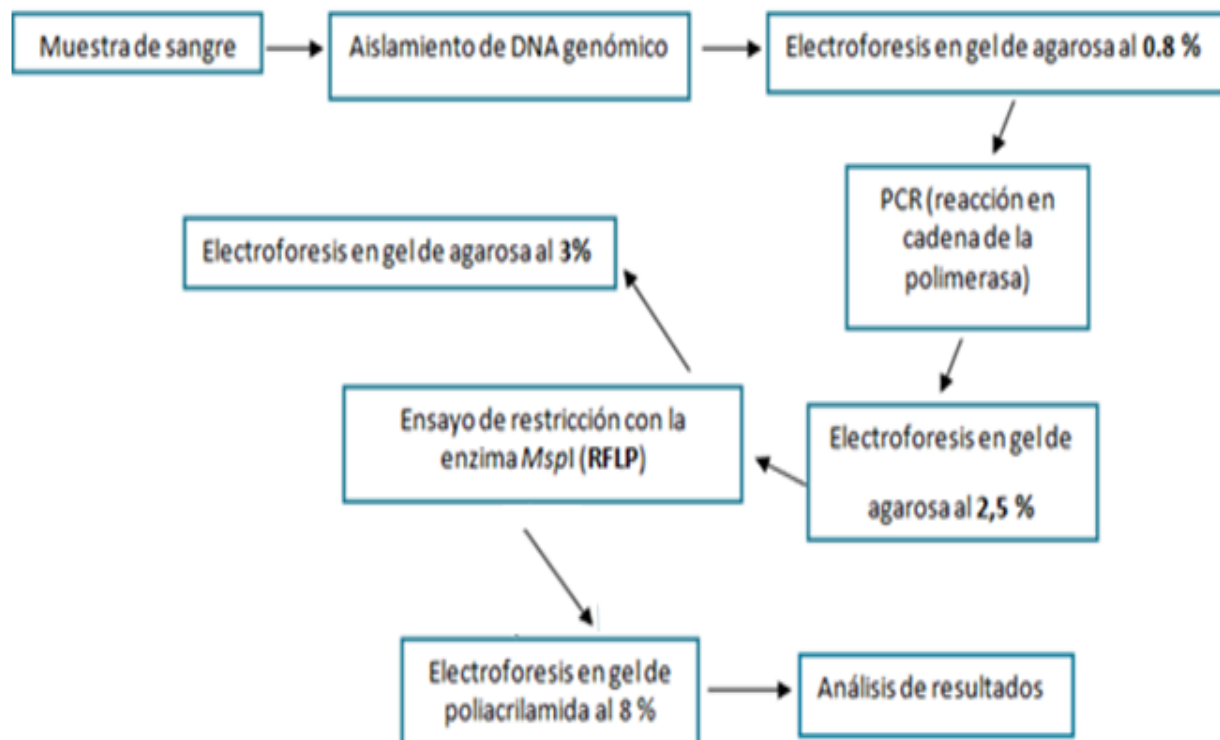


Figure 10. Diagrama de plan de trabajo

IV.3 Aislamiento de ADN genómico

El aislamiento de ADN genómico se realizó según el método establecido por Bowen y Keeney (2003), a partir de sangre congelada. Se dividió en tres partes principales: lisis celular, lisis nuclear y purificación del ADN genómico. Se inició agregando 700 µl de sangre fresca o que ha sido congelada, en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Luego se adicionaron 700 µl de Buffer de Lisis Celular (10 mM Tris-HCl (pH 8), 11 % p/v Sacarosa, 5 mM MgCl₂, 1 % v/v Triton X-100), se mezcló con el vortex brevemente y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a 2000 x *g* a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se agregó nuevamente 500 µl de Buffer de Lisis Celular, se mezcló con el vortex brevemente y se centrifugó durante 2 min a 2000 x *g* a temperatura ambiente, para luego ser descartado el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 300 µl de Buffer de Lisis Nuclear (10 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 10 mM Citrato de Sodio, 1 % p/v SDS) y se resuspendió el sedimento utilizando la pipeta. Se agregaron 100 µl NaCl 5,3 M y 500 µl de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó 5 minutos a 2000 x *g* a temperatura ambiente. Se tomaron 300-350 µl de la fase acuosa, se agregaron en un nuevo tubo con 600-700 µl de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión suavemente hasta que se observó la formación de la malla blanca de ADN. Una vez que se ha observado esta malla se centrifugó 10 minutos a 12.000 x *g* a temperatura ambiente. Luego se descartó el sobrenadante y se dejó secar el etanol completamente. Posteriormente se agregaron ~100 µl de agua estéril y se dejó resuspender 1-3 h. a temperatura ambiente. Las muestras obtenidas pueden ser visualizadas en geles de agarosa al 0,8 %.

IV.4 Amplificación del fragmento contentivo del polimorfismo g.10976 G>A mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Mediante la técnica de PCR, se amplificó el fragmento contentivo del polimorfismo g.10976 G>A en el FVII, con los cebadores siguientes: el cebador sentido (*primer forward*) 5' -CAGTCACGGAAGGTGGGAGAC- 3' y el cebador antisentido (*primer reverse*) 5' – GGGGTAATTGACGTCTTCTT-3', a los cuales se les determinó una temperatura de annealing de 56°C, y se espera un fragmento de tamaño de 206 pb, y se evaluó la presencia del polimorfismo de interés mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), empleando la endonucleasa *MspI*.

Para llevar a cabo la técnica se realizó una mezcla que presentó los siguientes componentes : ADN genómico 6 ng/μl, 1 X del Buffer para PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl), 2mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1 pmol/μl de cada cebador y 1,5 U/μl Taq DNA polimerasa. La reacción se llevó a cabo en un termociclador utilizando el programa que se presenta en la tabla 2. Estos pasos se repitieron 25 veces.

Una vez culminado el proceso de PCR, los fragmentos se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2,5 %.

Tabla 2. Programa utilizado para realizar la PCR

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial (paso 1)	94	5
Desnaturalización (paso 2)	94	1
Hibridación de cebadores o Annealing (paso 3)	56	1
Extensión (4 paso)	72	1
Extensión final (5 paso)	72	5

IV.5 Detección del polimorfismo g.10976 G>A mediante ensayo de restricción enzimática (RFLP) con la endonucleasa *MspI*.

Una vez obtenido el fragmento de 206 pb por la técnica PCR, se procedió a la identificación del genotipo del polimorfismo g.10976 G>A a través del ensayo de restricción usando la endonucleasa *MspI*. En la tabla 3 se muestran los compuestos y las concentraciones que se requirieron para realizar el ensayo de restricción, según las especificaciones de la casa comercial (Tabla 3). Los fragmentos obtenidos mediante la digestión enzimática se visualizaron en geles de poliacrilamida al 8% y en geles de agarosa al 3 %.

Tabla 3. Compuestos y concentraciones que deben mezclarse para la realización de la digestión enzimática.

Reactivos	Concentraciones	Cantidad (1X)	Condiciones
Agua	-	3,65	Temperatura óptima enzimática: 37°C Tiempo: 24 h
Buffer	1 X	1 µl	
Enzima (<i>MspI</i>)	0,25 u/µl	0,125 µl	
Producto PCR	-	5 µl	
BSA	0,1 mg/ml	0,1 µl	

IV.6 Electroforesis en geles de Agarosa

La cantidad y la calidad del ADN se evaluó en geles de agarosa. Previamente el material genético se mezcló con buffer de carga 1 X (5 % glicerol, 0,04 % azul de bromofenol y 0,04 % xilenecyanol) para luego ser añadidas en el gel de agarosa, el cual se preparó a una concentración de 0,8 % si se requería de la observación de muestras de ADN genómico, o a concentraciones de 2,5 % y 3% si se deseaba observar muestras de menor tamaño como producto PCR o productos obtenidos en digestiones enzimáticas. El tampón utilizado para realizar la electroforesis es el TAE 1X (40 mM Tris acetato, 1mM EDTA). La corrida electroforética se realizó empleando una cámara horizontal “Easy Cast” a voltaje constante de 100v durante 15 minutos. El ADN se visualizó por la fluorescencia del compuesto SYBR-safe, el cual puede detectar bandas con cantidades tan pequeñas como 20 pg de ADN.

IV.7 Electroforesis en geles de Poliacrilamida

Los productos obtenidos en la digestión enzimática con la enzima *MspI* también fueron visualizados en geles de poliacrilamida para la observación del patrón de bandas resultante. Los productos fueron mezclados con buffer de carga 1 X (5 % glicerol, 0,04 % azul de bromofenol, 0,04 % xilenecyanol) y posteriormente se cargaron en el gel de poliacrilamida al 8 %, 0,04 % de persulfato de amonio (APS), 8 % acrilamida-bisacrilamida, 5µl de TEMED y buffer TAE 1 X, para un volumen final de 5 ml. Para la corrida electroforética se empleó una cámara vertical Termo EC120, a 25 mA y 150v durante 30 minutos. Previo a la carga de la muestra, se realizó una precorrida del gel durante 15 minutos.

Para la visualización de las bandas en el gel de poliacrilamida se realizó el protocolo de revelado con nitrato de la plata, según Bradt y colaboradores, 1992. En primer lugar, se agregó la solución fijadora (10 % de etanol y 0,5 % de ácido acético glacial), luego se aplicó un lavado para eliminar el exceso de solución fijadora antes de aplicar la solución de impregnación (0,15 % de nitrato de plata). Esta solución permite la unión de la plata al ADN que ha sido fijado previamente, en este paso también fue necesario realizar un lavado para eliminar el exceso de plata y obtener un mejor resultado al precipitar la plata con la solución de revelado (200 µl de formaldehído al 37 %, 1,5 % hidróxido de sodio).

IV.8 Secuenciación

Una vez obtenidos todos los genotipos de todas los grupos de estudio mediante las técnicas anteriormente descritas, se procedió a escoger al azar distintas muestras para corroborar su genotipo mediante la técnica de secuenciación. Las muestras que fueron escogidas se

trasladaron a la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses ubicado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), el cual brinda servicios de secuenciación y análisis de ácidos nucleicos. Para ello se utiliza un secuenciador de ácidos nucleicos modelo ABI 3130XL.

Para realizar la secuenciación del fragmento de interés se realizó una PCR, para la cual se realizó una mezcla que presentó los siguientes componentes: DNA genómico 13,7 ng/μL, 1 X del Buffer para PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl), 2mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs' (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1 pmol/μL de cada cebador y 1,5 U/μL Taq DNA polimerasa. La reacción se llevó a cabo en un termociclador utilizando el programa que se presenta en la tabla 2.

Posteriormente se realizó la purificación del fragmento obtenido mediante el estuche comercial *AxiPCR cleanup*. La purificación se inició agregando 110 μl de buffer PCR-A y 30 μl de producto PCR, en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Luego se colocó una columna PCR en un tubo eppendorf de 2 ml, en el cual se agregó la mezcla realizada anteriormente. Una vez realizado el paso anterior, la muestra se centrifugó durante 1 minuto a 12000 x *g* a temperatura ambiente, posteriormente se descartó el filtrado del tubo eppendorf de 2 ml y se retornó la columna a este tubo. Luego se agregaron 700 μl del buffer W2 en la columna PCR y se centrifugó durante 1 minuto a 12000 x *g* a temperatura ambiente, posteriormente se descartó el sobrenadante del tubo eppendorf de 2 ml y se retornó la columna PCR al tubo anteriormente mencionado y se agregaron 400 μl del buffer W2 a la columna PCR, para luego centrifugar durante 1 minuto a 12000 x *g* a temperatura ambiente. Una vez descartado el filtrado, se transfirió la columna PCR a un tubo eppendorf de 1,5 ml, para luego agregar 25 μl del eluyente, el cual se calentó previamente a 65 °C. Una vez añadido, se dejó en reposo durante 1 minuto a temperatura ambiente y luego centrifugar durante 1 minuto a 12000 x *g* y así obtener el producto purificado.

IV.9 Análisis estadístico

Los primeros cálculos realizados fueron la determinación del promedio y la desviación estándar de la edad, el porcentaje (%) de hombres y mujeres presentes en el estudio, el % de individuos hipertensos, % de individuos que padecían de diabetes mellitus y % de individuos fumadores, todos estos cálculos se realizaron para todas las poblaciones analizadas.

Una vez obtenidos los datos de los genotipos tanto de la población control como de la población de pacientes se calcularon las frecuencias genotípicas mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Frecuencia genotípica} = \frac{\text{Número de individuos de un genotipo}}{\text{Número total de individuos}}$$

Una vez obtenida las frecuencias genotípicas se calcularon las frecuencias alélicas mediante la relación entre las frecuencias genotípicas, donde p y q son representados por los alelos del locus y las letras D, H y R las frecuencias de cada genotipo evaluado. En este caso la letra q representó el alelo A y la letra p el alelo G. Por su parte la letra D fue representada por la frecuencia del genotipo GG, la letra H representó la frecuencia el genotipo GA y la letra R la frecuencia del genotipo AA.

$$p = D + 1/2H \quad \text{y} \quad q = R + 1/2H$$

Posteriormente se realizó una evaluación en la población control con respecto a la distribución de los alelos, para constatar si dicha población se encontraba en Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W). Una vez evaluado el equilibrio se calculó la frecuencia genotípica y alélica del

polimorfismo para cada una de las poblaciones. Para valorar en qué medida se ajustan los resultados observados a los esperados en una situación de equilibrio H-W, se realizó la prueba estadística χ^2 .

Luego se calcularon las razones de proporciones, también denominadas “odds ratio” (OR), para los tres genotipos posibles del polimorfismo estudiado en cada población; entendiéndose por el Odds de un evento A, como el cociente entre la probabilidad de que el evento ocurra y que no ocurra, el cual se define como:

$$\text{Odds (A)} = \frac{P(\text{ocurra A})}{P(\text{no ocurra A})} = \frac{P(A)}{1 - P(A)}$$

De esta manera el OR, corresponde al cociente del “Odds” de un evento A entre el “Odds” de un evento B:

$$\text{Odds Ratio} = \frac{\text{Odds(A)}}{\text{Odds (B)}}$$

Si el Odds de un evento es 1, existe igual probabilidad de que el evento ocurra y de que no ocurra ($P(A) = P(\text{no A}) = 0,5$). Si el “odds” es mayor que 1 implica que lo más probable es que el evento ocurra, y esa probabilidad es tanto mayor cuanto más grande es el odds. A la inversa, si el “odds” es menor que 1, lo más probable es que el evento no ocurra (Bulla, 1998). De igual forma sucede con la interpretación de los valores del Odds Ratio, en donde si el

cociente resultante es mayor que 1, la probabilidad de que ocurra el evento A es mayor de que ocurra el evento B y viceversa.

Posteriormente, se realizó un análisis de correlación entre el IAM, el ACV y la TVP como variable dependiente (o variable respuesta) y las variables independientes: edad, sexo, hábito tabáquico, hipertensión, diabetes mellitus, presencia del polimorfismo g.10976 G>A; como variables explicativas mediante un análisis de regresión de curva logística. Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa estadístico Epi Info 2002.

La regresión logística es un tipo particular de regresión que se caracteriza porque la variable dependiente Y, sólo puede tomar dos estados, si el fenómeno ocurre (Y=1), o si no ocurre (Y=0). Es por esta razón que esta técnica puede utilizarse para discriminar entre dos grupos de casos. Otra ventaja de la regresión logística, es que las variables causa pueden ser prácticamente de cualquier tipo; pueden ser normales, ordinales o categóricas y pueden usarse incluso variables cualitativas de sólo dos estados (Bulla, 1998).

De esta manera, una vez determinada la matriz con las variables causa y la variable dependiente, se partió del modelo de regresión de curva logística más complejo el cual incluyó todas las variables causa (i, j, k y l):

Modelo 2:

$$\text{Probabilidad (infarto)} = \frac{e (\beta_{0ijklmn} + \beta_1 X_{\text{edad}})}{1 + e (\beta_{0ijklmn} + \beta_1 X_{\text{edad}})} ;$$

donde i = edad, j = sexo, j = DM, k = polimorfismo g.10976 G>A y l = polimorfismo g.10976 G>A.
--

Luego se procedió a determinar el modelo que mejor explicara la variabilidad de los datos, estableciendo así de todas las variables causas, cuáles fueron las más significativas como predictoras de IAM, de ACV y TVP. Para lograr esto, se utilizó el método de eliminación de variables no significativas por pasos hacia atrás, a partir del modelo de regresión más complejo (eliminación de variables en direction = “backward”), empleándose como criterio para su eliminación el coeficiente de determinación AIC (Criterio de Información de *Akaike*). Por consiguiente, en un modelo de regresión, el “mejor” modelo será aquél que tenga un AIC más pequeño, donde más deviancia total es explicada (Saldaña y Urcia, 2009).

IV.10 Financiamiento

El presente Trabajo de Grado fue financiado por el proyecto FONACIT G-2005000398 bajo la responsabilidad de la Prof. Antonietta Porco.

V. RESULTADOS

V.1 Análisis descriptivo de la población de estudio

La población analizada estuvo constituida en su totalidad por 385 individuos, de los cuales 112 conformaron el grupo de controles y 273 el grupo de pacientes. Estos últimos se subdividieron en tres grupos: el de pacientes que han sufrido IAM, conformado por 103 individuos, el grupo de pacientes que han sufrido de TVP, conformada por 101 individuos y el grupo de pacientes que han sufrido ACV, conformado por 69 individuos. Previo a la realización del análisis molecular, se procedió a la recopilación de algunos datos extraídos de las historias de los pacientes (suministrados por el servicio de cardiología del HDMPC y el HMDCA) y de las encuestas realizadas a los individuos controles.

El análisis datos recopilados permitió determinar que la población control presentó una edad promedio de $38,89 \pm 13,68$ años, mientras que la edad promedio de los pacientes que han sufrido IAM fue de $57,50 \pm 10,34$ años. Por su parte, la edad promedio de los pacientes que han sufrido TVP fue $40,99 \pm 14,97$ años, y de los que han sufrido ACV fue de $33,44 \pm 14,62$ (Tabla 4).

En cuanto a la distribución del sexo, se evidenció que el sexo femenino se encontraba en mayor proporción en el grupo de pacientes que han sufrido TVP, ACV y la población control, las cuales representaron el 82,76 %, 62,85% y 58,03% , respectivamente; por el contrario se encontró que para el grupo de pacientes que han sufrido IAM, el sexo masculino representó el 80,77%.

Por su parte, los individuos controles fumadores representaron el 24,05%, y el grupo de pacientes que ha sufrido IAM fue del 73,4%, contrario a los grupos que han sufrido TVP y ACV, en donde se observó que el 11,49% y 14,49% población presentó la práctica del hábito tabáquico.

En cuanto a la presencia de la hipertensión arterial, el grupo de pacientes que ha sufrido IAM presentó una proporción alta en relación a este parámetro clínico (75,75%) con respecto a los grupos de pacientes que han sufrido TVP y ACV, los cuales presentaron una proporción baja (16,09% y 10,29%, respectivamente); mientras que en los individuos controles, este estuvo presente en el 19,63%. En relación a la presencia de la Diabetes Mellitus se observó que en el grupo de pacientes que han sufrido TVP y ACV, estuvo presente en el 2,29% y 1,47%, respectivamente, por su parte, en el grupo con IAM estuvo presente esta condición en el 29,67%, mientras que en los controles estuvo representado por el 2,25% de los individuos (Tabla 4)

Tabla 4 . Parámetros de la población

	pacientes IAM	pacientes TVP	pacientes ACV	Controles
Edad promedio	57,50 ±10,34 años	40,99 ± 14,97 años	33,44 ± 14,62 años	38,89 ±13,68 años
Sexo femenino	19,23 %	82,76 %	62,85 %	58,03 %
Sexo masculino	80,77 %	17,24 %	37,14 %	41,96 %
Presencia de Hipertensión arterial	75,75 %	16,09 %	10,29 %	19,63 %
Presencia de hábito tabáquico	73,40 %	11,49 %	14,49 %	24,05 %
Presencia de Diabetes mellitus	29,67 %	2,29 %	1,47 %	2,25 %

V.2 Análisis Molecular

V.2.1 Aislamiento de ADN genómico (ADNg)

Para efectuar el análisis molecular del polimorfismo g.10976 G>A presente en el gen que codifica para el factor FVII de la coagulación sanguínea, se procedió a realizar inicialmente el aislamiento de ADNg a partir de muestras de sangre periférica obtenida de los individuos pertenecientes a los grupos (pacientes y controles) que conforman la población analizada.

En la figura 11 se presenta el registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de agarosa (0,8%) de ADNg extraído de algunas de las muestras analizadas. La presencia de una banda uniforme indica una buena integridad y además se obtuvo un buen rendimiento del material genético.

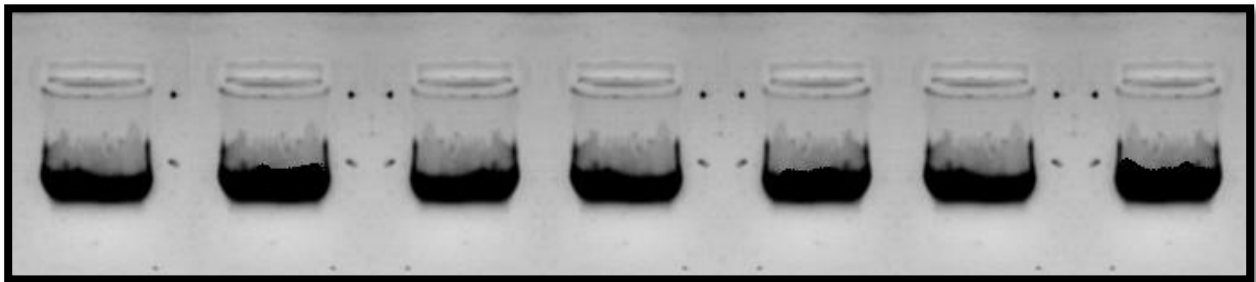


Figura 11. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. En la figura se observa ADNg extraído de algunos pacientes que han sufrido infarto agudo al miocardio (IAM) a los cuales se les realizó posteriormente el análisis molecular.

V.2.2 Determinación del genotipo para el polimorfismo g.10976 G>A mediante la técnica PCR-RFLP en controles y pacientes con IAM, ACV y TVP

Una vez realizada la extracción del ADNg, se procedió a realizar la detección del genotipo para el polimorfismo g.10976 G>A, mediante la técnica PCR-RFLP. Esta técnica se divide en dos fases: la primera fase se realiza una PCR convencional, en la cual se obtiene el fragmento contentivo del polimorfismo y es posteriormente visualizado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. Una vez obtenido el producto de interés se procede a realizar la segunda fase, en la cual se realiza una digestión enzimática mediante la endonucleasa *MspI*. Esta enzima es capaz de reconocer un sitio único de restricción que no es reconocido por la enzima si la secuencia del ADN contiene la base mutada (A), esto trae como consecuencia que no ocurra el corte enzimático; si por el contrario, está presente la base no mutada (G) en la secuencia, ocurre el corte enzimático.

En el fragmento amplificado, además del sitio de reconocimiento donde se encuentra la base polimórfica, existe otro sitio de reconocimiento para la enzima *MspI*. De esta manera, en presencia del alelo G ocurrirá la digestión enzimática en dos sitios del amplicón, generándose 3 fragmentos: de 21pb, 67pb y 118 pb, respectivamente (Figura 12). Por el contrario, en presencia del alelo A, se pierde un sitio de reconocimiento y en consecuencia no ocurre la digestión en el sitio polimórfico, generándose 2 fragmentos: 185 y 21 pb. Un individuo heterocigoto presentará un patrón de cuatro bandas: 185 pb, 118 pb, 67pb, 21pb, respectivamente y un individuo homocigoto mutado presentará sólo dos bandas de 185 pb y 21 pb, respectivamente (Figura 12).

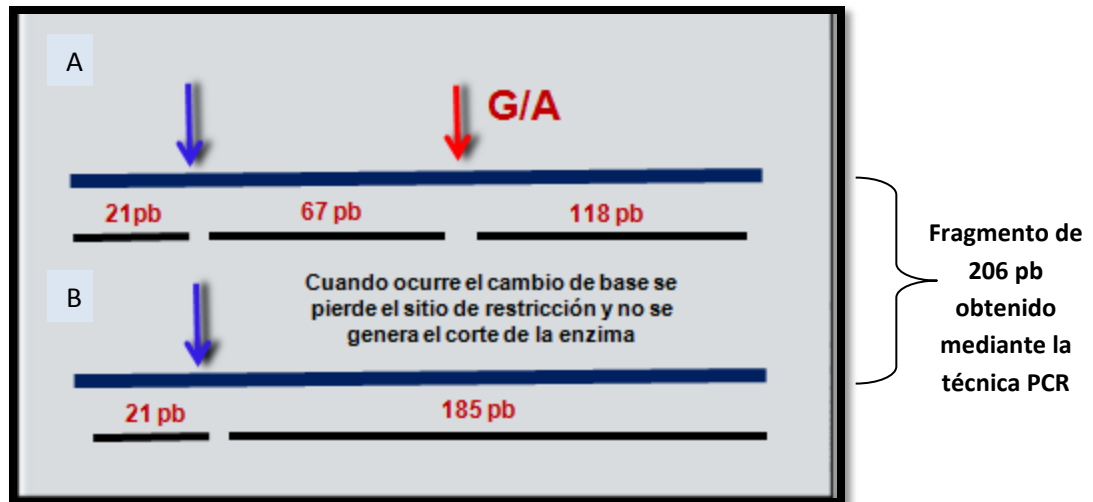


Figura 12. Esquema de los fragmentos obtenidos del corte enzimático con la endonucleasa *MspI* en el fragmento de 206 pb. En la figura se observan la ubicación de los dos sitios de restricción de la enzima y específicamente en la flecha roja donde se encuentra la base polimórfica de estudio. Cuando el individuo no presenta la mutación ocurre el corte enzimático en los dos sitios de restricción (A), y se obtienen 3 fragmentos que presentan un tamaño de 21 pb, 67 pb y 118 pb, pero si la mutación se encuentra presente no ocurre el corte enzimático en uno de los sitios de restricción (B), dando como resultado la obtención de dos fragmentos de 21 pb y de 185 pb.

Luego de efectuar la técnica PCR-RFLP, los resultados se observaron a través de una corrida electroforética en geles de agarosa al 3% y en aquellos casos en los cuales no se lograba observar los productos enzimáticos mediante electroforesis en gel de agarosa, se aplicaba electroforesis en gel de poliacrilamida.

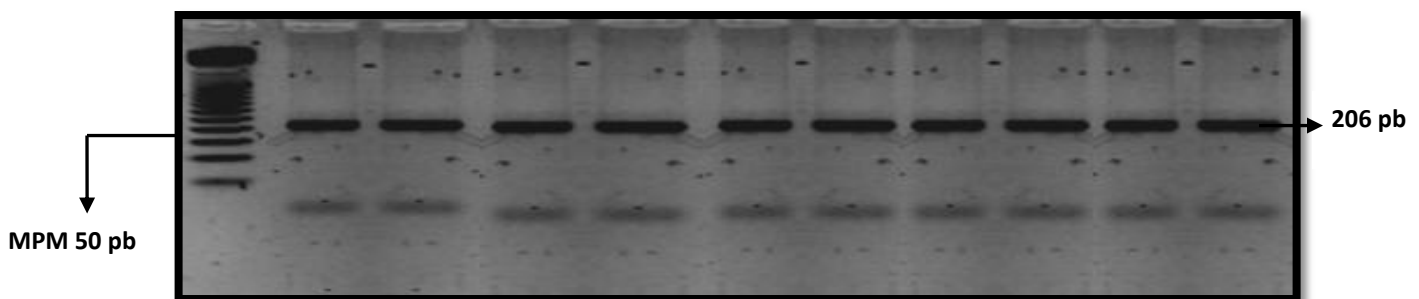


Figura 13. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 2,5%. En la figura se observa la amplificación de una única banda correspondiente al producto amplificado a partir de ADN aislado de pacientes que han sufrido infarto agudo al miocardio (IAM), además se puede visualizar el marcador de peso molecular de 50 pb en el carril uno (promega).

En la figura 13 se muestra el registro fotográfico de una de las electroforesis en gel de agarosa al 2,5 %, de los fragmentos obtenidos mediante la PCR que contienen el polimorfismo g.10976 G>A ubicado en el exón 8 del gen del FVII, utilizando los cebadores específicos indicados en la metodología (sección IV.4). En la figura, se muestran los resultados obtenidos en algunas de las muestras provenientes de pacientes que han sufrido IAM y se visualiza una banda con el tamaño esperado de 206 pb. Estos mismos resultados fueron obtenidos en todas las muestras de los grupos analizados.

En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos después de la digestión de los fragmentos amplificados con la enzima *MspI* en un grupo de muestras pertenecientes a pacientes con IAM. Se puede destacar la presencia de la banda de 185 pb en las muestras 014, 026, 028 y 029, indicando la presencia de la base mutada en uno de los alelos, por lo cual el genotipo de estos individuos analizados es heterocigoto (GA). Las demás muestras que se observan en la figura presentan únicamente dos bandas, una banda de 118 pb y otra de 67 pb, lo que indica la ausencia de la base mutada, por lo cual el genotipo de estos individuos analizados es homocigoto normal (GG). La banda de 21 pb no se observa en el registro fotográfico debido a que el tamaño del fragmento es pequeño y se sale del gel de agarosa en las condiciones de la corrida utilizadas.

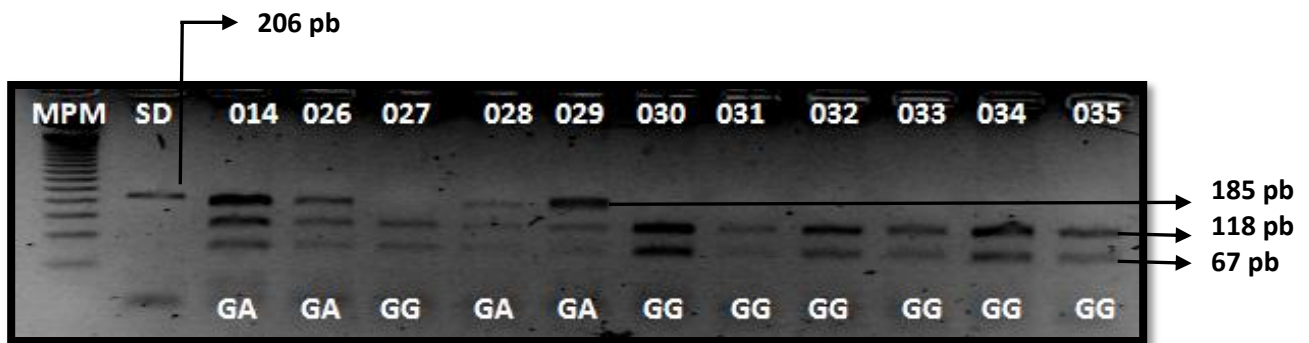


Figura 14. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 3%. En la figura se observa el patrón de bandas obtenido de la digestión enzimática a partir del fragmento contenido del polimorfismo de de pacientes que han sufrido infarto agudo al miocardio (IAM). Se observa que el patrón de bandas cambia generando la identificación de un genotipo distinto. Además se puede visualizar el marcador de peso molecular de 50 pb (promega) y en el carril 2 una muestra del fragmento de 206 pb que no ha sido digerido (SD).

En algunos casos, cuando no se observaron los fragmentos obtenidos de la digestión enzimática mediante la electroforesis en geles de agarosa al 3%, se realizaron las corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida al 8%. Al igual que en la electroforesis en gel de agarosa, se observaron patrones de bandas que permitieron distinguir cada uno de los genotipos. En la figura 15 se observa el resultado de una electroforesis en gel de poliacrilamida, en el cual se observan distintos patrones de bandas que permiten la identificación del genotipo de 6 individuos controles.

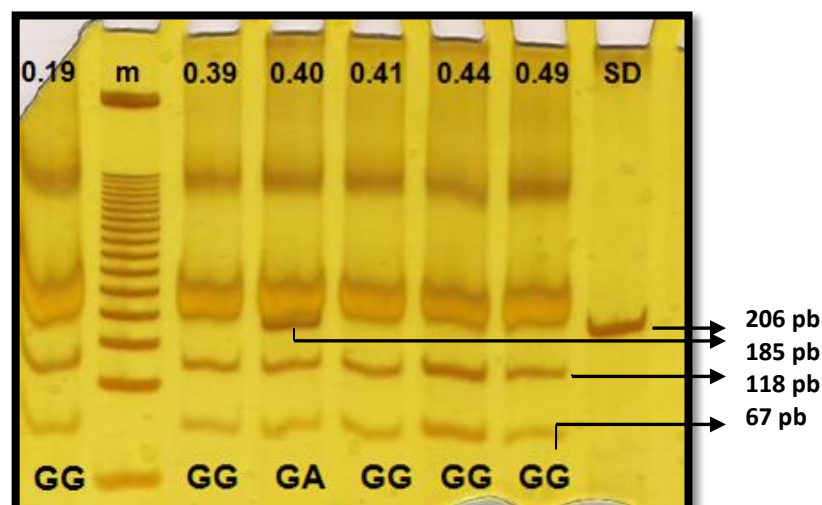


Figura 15. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. En la figura se observan los distintos patrones de bandas obtenidos luego de realizar la digestión enzimática con la endonucleasa *MspI*. Se observa en el último carril una muestra sin digerir (SD). Estos patrones de bandas permiten identificar el genotipo de cada una de las muestras provenientes de la población control. Marcador de peso molecular de 50 pb (m).

V.3 Frecuencias genotípicas y alélicas.

Del análisis de los genotipos derivados de los resultados obtenidos mediante PCR-RFLP de todas las muestras de cada grupo de la población de estudio, se determinaron las frecuencias genotípicas. Se obtuvo que, tanto para el grupo control como en los pacientes con IAM, TVP y ACV, el genotipo homócigo normal (GG) presentó la mayor prevalencia, (75,89, 62,13%, 76,24% y 71,01%, respectivamente). Así mismo, la mayor proporción de heterocigotos (G/A) y homocigotos mutados (A/A) se obtuvo para el grupo de pacientes con IAM (34,95%, 2,91%, respectivamente) (Figura 16 y Tabla 5). Basados en los cálculos de las frecuencias genotípicas de los grupo de la población analizada, se procedió a calcular las frecuencias alélicas. En la tabla 5 se destaca que la frecuencia del alelo 10976A para el grupo de pacientes que han padecido de TVP y los individuos controles es bastante baja. En el caso de la población que ha sufrido ACV difiere ligeramente de la población control, mientras que el grupo de individuos que ha padecido de IAM presenta una frecuencia mucho mayor a la obtenidas en los individuos controles, lo que indica que existe mayor presencia del alelo 10976A en este grupo.

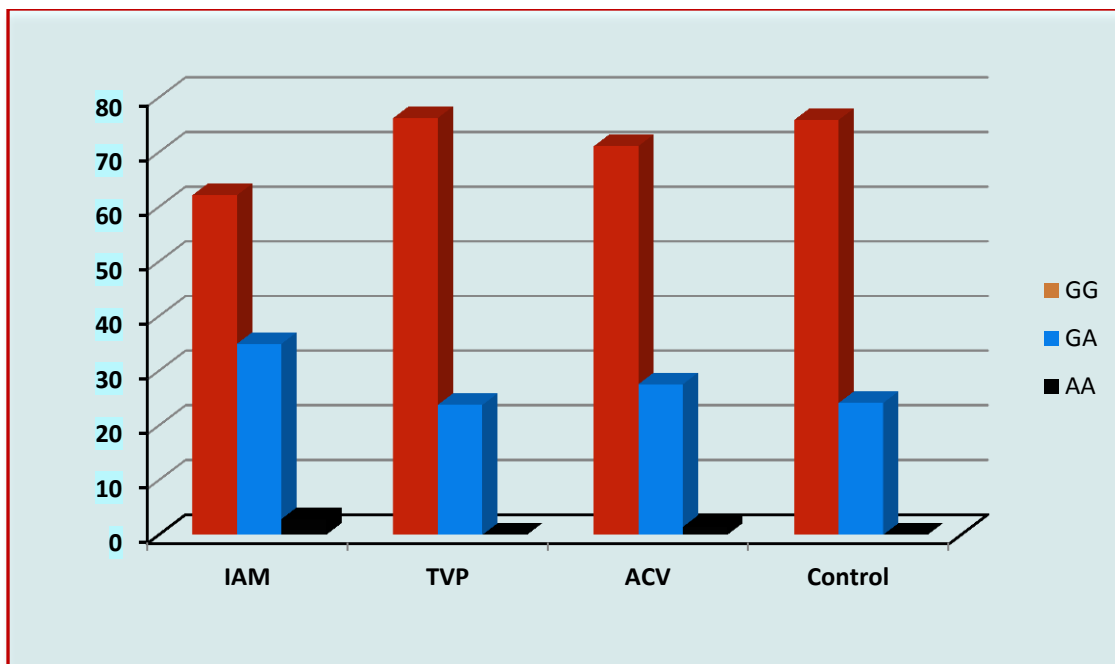


Figura 16. Composición de todos los grupos de estudio que constituyen la población de estudio. Según su genotipo para el polimorfismo g.10976 G>A. GG: Homocigoto normal, GA: Heterocigotos y AA: Homocigoto mutado.

Además se calcularon las frecuencias genotípicas para cada grupo de la población de estudio, las cuales se muestran en la tabla 5, en donde se puede apreciar que la mayor frecuencia está representada por el genotipo normal (GG), y se puede denotar que el genotipo homocigoto mutado (AA) presenta la menor frecuencia en cada grupo de estudio.

Tabla 5. Resultado de las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas para el polimorfismo g.10976 G>A para cada grupo de la población d estudio

Grupo de individuos que han sufrido IAM					
Genotipos g.10976 G<A	nº de individuos	% genotipo	Frecuencia genotípica	Frecuencia del alelo G	Frecuencia del alelo A
GG	64	62,13	0,6213		
GA	36	34,95	0,35		
AA	3	2,91	0,029	0,796	0,204
TOTAL	103	100	1	1	
Grupo de individuos que han sufrido TVP					
Genotipos g.10976 G<A	nº de individuos	% genotipo	Frecuencia genotípica	Frecuencia del alelo G	Frecuencia del alelo A
GG	77	76,24	0,762		
GA	24	23,76	0,238		
AA	0	0	0	0,881	0,119
TOTAL	101	100	1	1	
Grupo de individuos que han sufrido ACV					
Genotipos g.10976 G<A	nº de individuos	% genotipo	Frecuencia genotípica	Frecuencia del alelo G	Frecuencia del alelo A
GG	49	71,01	0,71		
GA	19	27,54	0,275		
AA	1	1,45	0,015	0,8475	0,1525
TOTAL	69	100	1	1	
Grupo de individuos controles					
Genotipos g.10976 G<A	nº de individuos	% genotipo	Frecuencia genotípica	Frecuencia del alelo G	Frecuencia del alelo A
GG	85	75,89	0,759		
GA	27	24,11	0,241		
AA	0	0	0	0,881	0,119
TOTAL	112	100	1	1	

V.4 Evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W)

Una vez calculadas las frecuencias genotípicas de cada uno de los grupos de la población en estudio, se procedió a comprobar si se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) en la muestra de controles como representación de la población general.

La prueba de H-W se estimó para el polimorfismo de interés mediante las frecuencias de cada uno de los alelos, pudiéndose constatar la existencia del equilibrio para la distribución genotípica de la población control, indicando que existe una probabilidad entre 10 y 15% de que las diferencias entre los casos observados y los esperados se deban al azar, por lo que se acepta que esta población se encuentra en equilibrio (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis del equilibrio de H-W para el polimorfismo g.10976 G>ubicado en individuos sanos como muestra representativa de la población venezolana.

Sitio polimórfico estudiado	X^2	p (1 g.l)
g.10976 G>A	0,211	2,70 – 2,07

G.L. = grados de libertad = N° de fenotipos (3) - n° de parámetros que estimo a partir de los datos de la muestra (1) - 1 (Suma de frecuencias observadas= Suma de frecuencias esperadas) = 3-1-1= 1 grado de libertad

V.5 Corroboración de los genotipos encontrados mediante secuenciación

Con la finalidad de corroborar los genotipos obtenidos mediante PCR-RFLP, se realizó la secuenciación en algunos de los fragmentos contentivos del polimorfismo g.10976 G>A. En la figura 17 se observa el electroferograma con el resultado de la secuenciación de una muestra de un paciente perteneciente a la población IAM. En este caso, el gráfico que se observa muestra parte de la secuencia, en donde se aprecia la presencia de la base A en los dos alelos en la

posición 10976, lo que confirma lo encontrado por PCR-RFLP, que indica que el paciente es homocigoto mutado (A/A).

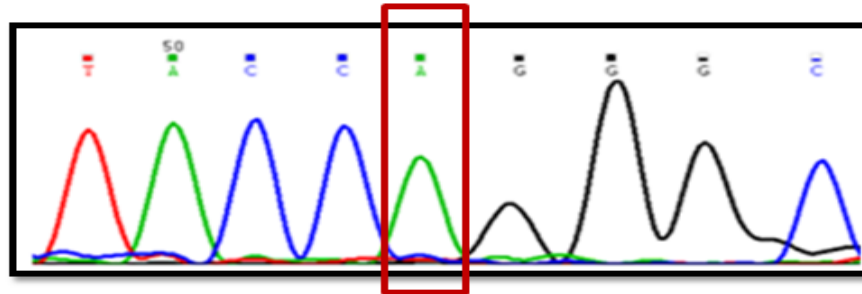


Figura 17. Registro fotográfico de un electroferograma. En la figura se puede observa señalada en cuadro rojo la presencia de la base polimórfica, en este caso se puede apreciar la presencia de la mutación en los dos alelos

En la figura 18 se observa otro de los resultado de la secuenciación de una muestra de un pacientes perteneciente al grupo de individuos que han sufrido de ACV, en este caso el gráfico que se observa muestra parte de la secuencia en donde se aprecia la presencia de la base G en los dos alelos en la posición 10976, lo que indica que el paciente es homocigoto normal (G/G), corroborando el resultado obtenido por la técnica PCR-RFLP.

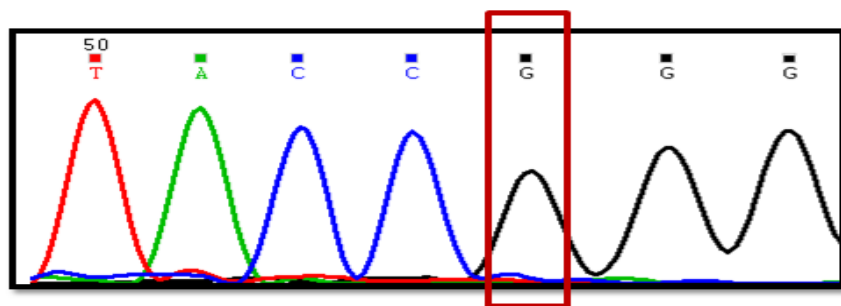


Figure 18. Registro fotográfico de un electroferograma. En la figura se observa señalada en cuadro rojo la base polimórfica, en este caso no se observa el cambio de base en ninguno de los dos alelos.

En la figura 19 se observa el resultado de la secuenciación de una muestra de un paciente perteneciente a la población TVP, que resultó por las pruebas moleculares heterocigoto (G/A). Se observa en la secuencia la presencia de la base G en un alelo y la presencia de la mutación en

el otro alelo en la posición 10976, corroborando el resultado obtenido mediante la técnica PCR-RFLP.

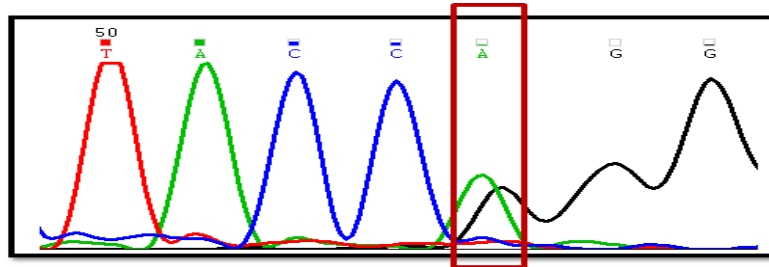


Figura 19. Registro fotográfico de un electroferograma. En la figura se observa señalado en cuadro rojo la base polimórfica, en este caso se puede apreciar la presencia de un doble pico, lo que indica que la mutación ha ocurrido solo en uno de los alelos.

V.6 Análisis estadístico de la población de estudio

V.6.1 Análisis estadístico univariado del polimorfismo g.10976 G>A, y su relación con el infarto agudo al miocardio (IAM), trombosis venosa profunda (TVP) y accidente cerebro vascular (ACV).

Con la finalidad de determinar si existe alguna relación entre la presencia del polimorfismo estudiado y el riesgo de sufrir las patologías, se procedió a calcular la razón de proporciones, la cual se aplicó evaluando los distintos genotipos del polimorfismo de interés en ambos grupos (pacientes y controles). La evaluación de los odds ratio (OR) permite expresar la proporción de veces que un suceso ocurra frente a que no ocurra. En la tabla 8 se pueden observar los resultados del análisis, en los cuales se evidenció que para el polimorfismo g.10976 G>A en la población de pacientes que han padecido IAM presentó un OR >1, indicado que fue 1,92 veces más probable encontrar el alelo A en el grupo de infartados que en el grupo de

individuos controles, este valor fue estadísticamente significativo. Para el grupo de individuos que ha sufrido de TVP, ésta presentó una proporción cercana a uno (0,98), indicando que el incremento del riesgo no es notable, y no puede establecerse una relación. Por último la población de pacientes que han sufrido ACV presentó una proporción ligeramente mayor a uno, indicando que es 1,28 veces más probable encontrar el alelo A en el grupo de pacientes que han sufrido ACV que en el grupo de individuos controles, pero no fue estadísticamente significativo.

Tabla 7. Relación de las poblaciones estudiadas con la presencia del alelo A, a través de la razón de proporciones.

Población	Alelo	Razón de proporción	Intervalo de confianza	p-valor	Relación
IAM	A	1,92	1,02 - 3,61	< 0,05	Si
TVP	A	0,98	0,73 - 1,93	> 0,05	No
ACV	A	1,28	0,62 - 2,67	> 0,05	No

V.6.2 Interacción del polimorfismo g.10976 G>A junto a otros factores de riesgo en el desarrollo de las diferentes patologías trombóticas.

Las patologías trombóticas como el IAM, la TVP y el ACV se han caracterizado por ser enfermedades multifactoriales, por lo cual se procedió a analizar los datos obtenidos de las historias clínicas y encuestas realizadas mediante un modelo de regresión logística binaria o bivariada. Dicho análisis permite relacionar la acción de variables independientes con una respuesta dicotómica, que en este caso sería la presencia o ausencia de la patología.

El modelo evaluado fue la variable condición (presencia o ausencia de la enfermedad) contra las variables sexo, edad, presencia de hipertensión arterial, presencia de diabetes mellitus, hábito tabáquico y el genotipo del polimorfismo g.10976 G>A. La variable sexo presenta dos categorías correspondientes al sexo masculino (M) o femenino (F), la edad fue medida en años, mientras que la hipertensión arterial, diabetes mellitus, hábito tabáquico y el polimorfismo g.10976 G>A, bajo dos categorías (sí o no). Por último, la variable independiente y, como presencia o ausencia de la patología.

Para realizar dicha regresión se tomaron todas las variables causa y sus posibles interacciones. Los resultados obtenidos indican que para este modelo, las variables edad (mayor de 50 años), sexo masculino, hipertensión y hábito tabáquico se encuentran relacionados con el padecimiento del IAM (tabla 8). Para el caso de la población de pacientes que han sufrido TVP se obtuvo que la variable sexo femenino se encuentra relacionada con el padecimiento de esta patología y por último, para el caso de la población de pacientes que han sufrido de ACV no se observó ninguna variable relacionada con el padecimiento de esta patología. En este punto es importante destacar que para realizar una regresión logística los datos deben ser homogéneos, es decir, cada muestra incluida en el análisis debe presentar los datos completos para todas las variables que se están evaluando (tabla 8).

Tabla 8. Análisis de regresión logística bivariada del impacto de distintos factores de riesgo en el desarrollo de IAM, TVP y ACV

Pacientes	Variable	B	ES	Valor Z	p-valor
IAM	Constante		0,98846	-6.112	9,85e ⁻¹⁰
	Edad	-6,0412 0,06869	0,01879	-2,82	0,000257
	Sexo Masculino		0,49835	3.655	0,017
	Hipertensión	1,73522	0,8182	3.868	0,00011
	Habito tabáquico	1,92749			
		1,99067	0,45473	4.378	1,20e ⁻⁰⁵
TVP	Constante				
	Sexo femenino	1	0,5266	2	0,01688
ACV		0,9057	0,3109	2,914	0,00357
	Constante				
	Edad	0,20771	0,85767	0,242	0,809
	Sexo Masculino	-0,0034	0,0136	-0,247	0,805
	Hipertensión	-0,3288	0,36957	-0,89	0,374
	Habito tabáquico	-0,3532	0,65512	-0,539	0,59
		-0,2733	0,47762	-0,572	0,567

VI. DISCUSIÓN

Entre las enfermedades no transmisibles, las enfermedades vasculares ocupan un lugar preponderante en muchos países a nivel mundial, principalmente en el hemisferio occidental. Aquellas relacionadas con la trombosis son las causas más comunes de morbilidad y mortalidad en los países de este hemisferio, principalmente en la mayoría de los países en vías de desarrollo, por lo cual han sido objeto de estudio durante las últimas décadas. Debido a la alta incidencia de las enfermedades trombóticas en el mundo, distintos investigadores se han enfocado en estudiar las causas por las cuales éstas se producen, las medidas para limitar el daño luego de que ocurren y las medidas para prevenirlas, con el fin de lograr disminuir su incidencia, generar un diagnóstico preventivo y el apropiado tratamiento, y así, reducir la morbilidad asociada a estas patologías. Recientemente, numerosos estudios se han enfocado en evaluar la asociación entre las patologías trombóticas y la presencia de diferentes factores de riesgo que promueven la hipercoagulabilidad sanguínea, la cual puede ser ocasionada por la perturbación en la regulación y el balance de la hemostasia, generando principalmente hemorragias o trombosis, siendo esta última de importancia en este trabajo. Diferentes estudios han demostrado que la alteración de todos los mecanismos involucrados en este proceso puede generar la formación de trombos sin existir daño vascular, por lo cual, ha sido estudiado extensamente el funcionamiento de este proceso así como su integración funcional.

Recientemente numerosos estudios se han avocado a evaluar la asociación entre las distintas enfermedades trombóticas y la presencia de factores de riesgo de origen genético del tipo pretrombóticos que promueven la hipercoagulabilidad sanguínea (Lane y Grant, 2000). Además, los investigadores han enfocado sus trabajos en identificar genes con polimorfismos

que se dan en la población con mayor frecuencia y que podrían influir en el riesgo de padecer una enfermedad.

Basados en lo mencionado anteriormente y teniendo en cuenta el hecho que la hipercoagulabilidad es un factor de riesgo determinante en las enfermedades trombóticas y el FVII es una proteína clave en el comienzo del proceso de la coagulación. Este trabajo se centró particularmente en el análisis del polimorfismo g.10976 G>A, presente en la región codificante del gen que codifica para el factor VII de la coagulación humana, investigación realizada por primera vez en una muestra de la población venezolana. Este polimorfismo se ha reportado que genera un efecto en los niveles plasmáticos de esta proteína y es por ello que se ha asociado en distintos casos con el desarrollo de las patologías trombóticas.

VI.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo g.10976 G>A de los diferentes grupos de estudio.

En este trabajo se reportan por primera vez en Venezuela las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo g.10976 G>A obtenidas en población en una población de estudio que incluyó individuos sanos y pacientes con trombosis. En relación al grupo de individuos controles, los resultados obtenidos en el presente trabajo (tabla 5) son muy similares a los derivados del trabajo realizado por el grupo Thrombosis and Vascular Biology, en una población italiana, en el cual se obtuvo que la frecuencia del genotipo normal (GG) fue de 0,71, para el genotipo heterocigoto (GA) fue de 0,265 y para el genotipo homocigoto mutado (AA) fue de 0,018 (Thrombosis and Vascular Biology italian study group, 2003).

Contrariamente, en otros estudios realizados en poblaciones europeas, los valores de las frecuencias genotípicas difieren considerablemente. En una investigación realizada por Ardissino

y colaboradores, en un grupo de individuos provenientes de una población italiana aparentemente sana, la frecuencia para el genotipo GG fue de 0,65, mientras que para el genotipo GA fue de 0,28 y para el genotipo AA fue 0,025. (Ardissino y col., 1999) También, se han realizado estudios en individuos con ascendencia árabe, en los cuales los resultados obtenidos igualmente difieren considerablemente con los alcanzados en el presente trabajo. Específicamente, Nour y colaboradores obtuvieron en dicha población valores de 0,625 para el genotipo homocigoto normal, 0,324 para el genotipo heterocigoto y 0,051 para el genotipo homocigoto mutado. A su vez, en otros estudios realizados en poblaciones africanas se han obtenido valores de frecuencias genotípicas muy parecidas a las obtenidas en las poblaciones provenientes de descendencia árabe (Mtiraoui y col., 2005).

Así mismo, se observó que en el grupo de individuos controles la frecuencia alélica para el alelo G fue 0,8891 y para el alelo A fue 0,119, las cuales son muy similares a las obtenidas por Green y colaboradores en el año 1991. Estos autores realizaron un estudio en una población de Londres, la cual estuvo comprendida por 284 individuos, aparentemente sanos, en la que obtuvieron para el alelo A una frecuencia de 0,11 y para el alelo G de 0,89. Otros estudios que se han realizado en poblaciones pertenecientes al continente africano presentan frecuencia alélicas mucho mayores a las obtenidas en este estudio y en poblaciones europeas. Tal es el caso de la investigación realizada por Nour y colaboradores en el año 2005, en una población perteneciente a Túnez, en la cual analizaron 176 individuos sanos, donadores de sangre, y observaron que la frecuencia del alelo A fue de 0,213 y para el alelo G fue de 0,787, muy diferentes a las obtenidas en este trabajo. Estos resultados demuestran que la distribución de los alelos del polimorfismo g.10976 G>A es altamente heterogénea en las diferentes poblaciones, lo que sugiere la influencia del origen étnico en dicha distribución.

En relación a los resultados de las frecuencias genotípicas obtenidas en este trabajo en el grupo de individuos que han sufrido IAM, estos difieren considerablemente a los obtenidos en los individuos controles (tabla 5). Es importante destacar que las frecuencias obtenidas para los genotipos heterocigoto y homocigoto mutado en el grupo de pacientes con IAM fueron las más altas en comparación con todos los grupos analizados.

Al comparar los resultados obtenidos en el grupo de pacientes con IAM, con otros estudios realizados en el mismo tipo de pacientes, se encontraron diferencias. En un estudio realizado por Iacoviello y colaboradores en el año 1998 en una población italiana el valor obtenido para el genotipo GG fue 0,695, para el genotipo GA se obtuvo una frecuencia de 0,299 y para el genotipo AA se obtuvo una frecuencia de 0,006. En otra investigación realizada por Owagua y colaboradores en el año 2004 en una población asiática, específicamente japonesa, en la cual se analizaron 127 individuos que han sufrido IM y 150 individuos aparentemente sanos, obtuvieron que la frecuencia para el genotipo GG fue de 0,921 para el grupo de individuos que han sufrido IM, para el genotipo GA fue de 0,078 y por último, para el genotipo AA no se obtuvo ninguna frecuencia. Además en una investigación realizada por Taymaz y colaboradores en el año 2007 en poblaciones turcas, las frecuencias obtenidas fueron muy similares a las reportadas en la población italiana.

Los valores de frecuencias genotípicas obtenidos en el grupo de individuos que han sufrido ACV, no difieren considerablemente de la población control. Es importante mencionar que este grupo estuvo conformado por un número de individuos menor en comparación con los otros grupos, lo cual podría estar afectado el resultado real. En este caso, la frecuencia del alelo G fue de 0,8475 y la frecuencia del alelo A fue 0,1525, valores que no difieren significativamente del grupo control. Es importante destacar que los valores obtenidos en este estudio son muy

similares a los obtenidos por Heywood y colaboradores en el año 1997, quienes analizaron una población perteneciente a diferentes grupos étnicos. En el estudio se obtuvo que la frecuencia del alelo A fue de 0,12 mientras que para el alelo G fue de 0,88. Estos resultados indicaron que no se obtuvo ninguna correlación entre el alelo mutado y la enfermedad, y sugieren que una de las razones más relevantes por las cuales no encontraron una relación positiva fue por la inclusión de distintos grupos étnicos en el estudio.

Para el grupo de individuos que han sufrido de TVP, las frecuencias genotípicas son muy similares a las obtenidas en el grupo control. Esta similitud en los valores entre estos dos grupos puede indicar que el polimorfismo no presenta ninguna relación con la patología.

Es necesario destacar que las variaciones entre las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas en este trabajo y las obtenidas en distintos estudios realizados en diferentes partes del mundo difieren considerablemente, ésta variedad en las frecuencias puede ser causada por las diferencia entre los grupos étnicos de cada uno de los estudios, así como el entorno ambiental en el cual se desenvuelven las poblaciones analizadas, además es importante acotar que la población venezolana se origina a partir de diferentes grupos étnicos, lo cual puede generar que las frecuencias no sean muy similares a las obtenidas en otros trabajos (Moniek y col., 1997; Lane y Grant, 2000).

VI.2 Asociación del genotipo del polimorfismo g.10976 G>A con las diferentes patologías trombóticas.

Luego de obtener las frecuencias genotípicas y alélicas de los distintos grupos de estudio, se procedió a la evaluación del equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) en el grupo control de los alelos del polimorfismo g.10976 G>A. Esta prueba considera que las frecuencias génicas y

genotípicas se mantienen constantes de generación en generación, lo que permite determinar las frecuencias que deben ser observadas en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos (Ziegler, Van Steen y Wellek, 2010). La prueba de H-W se estimó para el polimorfismo de interés mediante las frecuencias de cada uno de los alelos, pudiéndose constatar la existencia del equilibrio para la distribución genotípica de la población control, indicando que la probabilidad de que las diferencias entre los casos observados y los esperados se deban al azar, es entre un 10 y un 15%, lo cual indica que este grupo no se encuentra sometido a mutación, selección o migración, representando una situación estática en la que la estructura génica no cambia.

Una vez establecido que los alelos del polimorfismo estudiado se encuentran en equilibrio se procedió a determinar la asociación del genotipo con el desarrollo de la patología. En primer lugar se procedió al calcular la razón de probabilidades (OR) en los 3 grupos de pacientes. Solamente se encontró un $OR > 1$, estadísticamente significativo, en el caso del grupo de pacientes con IAM. Particularmente, para este grupo se obtuvo que es hasta 1,92 veces más probable la presencia del alelo A, lo cual indica que existe una asociación entre el alelo mutado y la patología. Esta correlación positiva también fue reportada en un estudio realizado por Shanker y colaboradores, en el año 2009 en una población indú, en el cual analizaron 222 individuos afectados con enfermedades de arteria coronaria y 105 individuos sanos. Del análisis realizado se reportó que es 2,472 más probable encontrar el alelo mutado en los individuos que han sufrido enfermedades coronarias con respecto a los individuos sanos, lo que les permitió sugerir que la presencia del alelo A aumenta el riesgo a padecer enfermedades en las arterias coronarias.

Aunque en el presente trabajo y en el estudio realizado por Shanker y colaboradores en el año 2009, se obtuvo correlación con el IAM, en otros estudios realizados en poblaciones

europeas, no se ha encontrado tal correlación. Investigaciones realizadas en poblaciones italianas se han reportado valores de OR iguales a 1, lo que indica que existe igual probabilidad de que el polimorfismo esté presente en la población control como en la población de individuos infartados (Ardissino y col., 1994; Iacoviello y col., 1998; Girelli y col., 2000). Otros trabajos realizados en poblaciones asiáticas, específicamente poblaciones japonesas, no han encontrado relación entre el infarto agudo al miocardio y el polimorfismo de interés en este trabajo. Además en estudios realizados por otros investigadores, se ha tratado de correlacionar el alelo A del polimorfismo g.10976 G>A con patologías cardiovasculares (van't Hooft y col., 1999; Mtiraoui y col., 2005; Taymaz y col., 2007), sin embargo no se ha reportado dicha asociación.

Aunque para el grupo de individuos que han sufrido de ACV se obtuvo que es 1,28 veces más probable encontrar la presencia del alelo A, este resultado no fue estadísticamente significativo. Sin embargo, este valor podría indicar que existe una asociación entre el alelo A y el desarrollo de la patología, y la falta de significancia estadística se deba al bajo *n* poblacional empleado en este grupo.

Por último, para el grupo de individuos que han sufrido de TVP se determinó que el OR era 0,98, este valor es cercano a uno, lo que indica que existe igual probabilidad de encontrar el alelo A tanto en este grupo de pacientes como en el grupo control, indicando que no existe correlación positiva entre el polimorfismo y la enfermedad.

Es importante señalar que la mayoría de los estudios que investiga el papel del genotipo del polimorfismo g.10976 G>A, han estado enfocados hacia las patologías trombóticas arteriales, ya que en el sistema arterial, debido a la presencia de las placas de ateroma, las cuales originan lesiones endoteliales, generan la exposición de proteínas como el FT, lo que hace más probable la activación de la coagulación por parte del FVII en comparación de las patologías trombóticas

venosas. La formación de un trombo venoso en este sistema ocurre específicamente por la disminución de la velocidad de la sangre en las zonas aledañas a las válvulas, debido a que en estos sitios hay ambiente reológico propicio, la velocidad de la sangre es menor y la corriente local es casi estática, lo cual favorece que se encuentren más factores de coagulación y procoagulantes generando su acercamiento. Además, debido a que generalmente no ocurre una lesión en el endotelio venoso, tampoco se genera la exposición del cofactor de la proteína de interés en este estudio, lo que indica que es menos probable que la activación de la coagulación se origine por esta vía, lo cual explicaría la falta de asociación encontrada en los pacientes con TVP.

Por el contrario, las patologías trombóticas arteriales ocurren bajo presiones sanguínea altas en donde la ruptura de la placa de ateroma expone distintas proteínas, generando la estimulación del proceso de coagulación (Lane y Grant, 2000). Además la obstrucción de las arterias involucra trombos generalmente pequeños mientras que para la obstrucción de una vena se requiere de un gran coágulo, así como el exceso de inductores de trombosis.

VI.3 Posible efecto del alelo A del polimorfismo g. 10976 G>A en la funcionalidad del FVII

La activación del proceso de coagulación requiere principalmente de la unión de la proteína FVII con el FT, y para ello, es de vital importancia la región catalítica del FVII (Kelley y col., 2004). El polimorfismo g.10976 G>A, descrito por primera vez por Green y colaboradores en 1991, caracterizado por el cambio del nucleótido guanina por el nucleótido adenina, generando el cambio del aminoácido arginina por el aminoácido glutamina en el residuo 353 de la proteína, se encuentra ubicado en la región catalítica de la proteína, muy cerca del residuo 344, caracterizado por ser uno de los sitios activos de esta región. El cambio que genera el alelo A de

este polimorfismo resultaría en un cambio de carga dentro de esta región de la proteína, lo cual puede traer como consecuencia que la estructura terciaria puede ser alterada, afectando las propiedades catalíticas de la misma, así como su proceso extracelular e intracelular, indicando que esta mutación genera un cambio de base funcional que afecta directamente a las propiedades del producto de la proteína (Green y col., 1991).

Desde que este polimorfismo fue reportado, se han publicado distintos estudios, los cuales se han llevado a cabo en distintas partes del mundo (Italia, Reino Unido, Estados Unidos, Japón, China, India, entre otros), los cuales han relacionado esta mutación con la variación de los niveles del factor VII en plasma. En éstas investigaciones se reportan resultados controversiales sobre papel del genotipo de dicho polimorfismo en los niveles del FVII (Iacoviello y col., 1998; van't Hooft y col., 1999; Girelli y col., 2000; Wu y col., 2001). En la mayoría de estos estudios, suelen medirse tanto los niveles de FVII en plasma, como los niveles de FVII antigénico (FVIIag), determinando la concentración proteica del factor, como del factor VII coagulante (FVIIc), el cual refleja fundamentalmente la fracción de FVII presente en el plasma que está activado. Estos valores se correlacionan con el genotipo de los distintos grupos de estudio, así como se calcula la razón de probabilidad (OR) que el polimorfismo esté relacionado con el riesgo de padecer una patología en particular. Además, esos resultados se relacionan con la presencia de otros factores como la hipertensión, el nivel de lípidos en sangre, la presencia de diabetes de diferentes tipos y el hábito tabáquico. Estas publicaciones reportan que niveles del factor VIIag disminuyen en presencia del alelo A, específicamente en aquellos individuos con el genotipo homocigótico mutado AA, por lo cual sugirieron la posibilidad de que este polimorfismo puede ejercer un efecto protector contra las patologías trombóticas (Humphries y col., 1994; Hunault y col., 1997).

En otra investigación realizada por Dickinson y Ruf en 1996, donde analizaron exhaustivamente la región catalítica del FVIIa empleando mutagénesis sitio dirigida, incluyendo la mutación de interés de este trabajo. La presencia del alelo mutado A no generó ningún cambio en la activación de la molécula ni un cambio en la especificidad por el sustrato de la proteína. Otras mutaciones realizadas en codones que codifican para residuos de la proteína cerca del residuo 353, de importancia en este trabajo, se mostraron estar implicadas en la unión a TF, mientras que el residuo 341 ubicado en la hendidura catalítica estuvo implicado fundamentalmente en la función proteolítica y especificidad de sustrato del FVIIa.

En otra investigación en la cual se corroboró que ocurre una disminución en los niveles del FVII en el plasma en presencia del alelo A del polimorfismo g.10976 G>A, fue la realizada por Hanault y colaboradores (1997). Estos autores investigaron si el genotipo del polimorfismo g.10976 G>A estaba independientemente asociado con la reducción de este factor en plasma. Realizaron un ensayo de transfección en células COS con el vector de expresión pLEDFVIIwt, el cual contenía el ADNc del FVII de humano con el alelo G o con el alelo A. En ambos casos, luego de la expresión del FVII recombinante se analizó el contenido de la proteína tanto en el sobrenadante (extracelular) como en células lisadas (intracelular). Observaron que los niveles de FVIIag tanto extracelular como intracelular en los cultivos de las células transfectadas con el plásmido que contenían las construcciones que no presentaban la mutación eran muy similares, mientras que para las células que presentaba la construcción con el plásmido que presentaba la mutación era mayor el contenido del FVIIag intracelular. Estos autores sugirieron que la substitución del aminoácido arginina por el aminoácido glutamina reduce la secreción del FVIIag y que el alelo A del polimorfismo no altera la actividad específica del FVII.

La estructura tridimensional preliminar de la proteína sugiere que el residuo 353 está en el lado opuesto de la molécula, frente al sitio activo. Esta ubicación periférica apoya la posibilidad que la sustitución influye en las interacciones del FVII con superficies de fosfolípidos, en consecuencia, está involucrada en la interacción entre las lipoproteínas ricas en triglicéridos y la molécula de FVII, lo cual pudiera alterar la fuerza de esta interacción y afectar la velocidad de división de la cadena simple de la forma no activada (Humphries y col., 1994).

Finalmente, los estudios revisados indican que el alelo A del polimorfismo g.10976 G>A está relacionado con la disminución de los niveles del FVII de la coagulación debido a que la mutación genera que la secreción de la proteína se reduzca.

Contrariamente a lo dicho anteriormente, en este estudio se obtuvo una relación positiva entre el genotipo del polimorfismo y el IAM, lo que indica que aunque se ha sugerido que la mutación afecta la secreción de la proteína al plasma, también puede afectar la interacción con otras moléculas y como consecuencia generar la activación de la misma y así, la activación del proceso de coagulación (Saha y col., 1994).

VI.4 Otros factores de riesgo asociados con el riesgo de desarrollar patologías trombóticas.

Otros factores de riesgo asociados con el desarrollo de las patologías trombóticas se encuentran relacionadas directamente con la alteración del mecanismo hemostático y el subsecuente daño a las paredes de los vasos sanguíneos así como al aumento de la viscosidad de la sangre (Lane y Gant, 2000). El aumento en los niveles de colesterol, el hábito tabáquico, la diabetes mellitus, la obesidad y la hipertensión arterial aumentan la viscosidad de la sangre, y estos cambios en la viscosidad sanguínea a causa de la edad y el sexo se debe a la elevación de

glóbulos rojos que presentan mayor envejecimiento celular, que en la mujer se reemplazan rápidamente antes de la menopausia por la menstruación (Kameneva y col., 1998).

A medida que aumenta la edad, la actividad del corazón tiende a deteriorarse, además ocurre el aumento del grosor de las paredes del corazón, las arterias pueden endurecerse y perder su flexibilidad, como también ocurre la deposición de la grasa, lo que genera que el corazón no pueda bombear eficientemente la sangre hacia todo el organismo. Adicionalmente, a medida que aumenta la edad, el tipo de vida es más sedentario, de tal forma que la sangre se mueve lentamente y es más propensa a coagular (Baskurt, 2003).

En el presente trabajo se observó que la edad promedio de los pacientes que han sufrido IAM fue mayor ($57,50 \pm 10,34$) que la del grupo control ($38,89 \pm 13,68$). Del análisis de regresión de curva logística de la población analizada, se obtuvo una correlación positiva (con una significancia mayor al 95%) entre la edad y la ocurrencia del IAM. Estos resultados apoyan que a medida que avanza la edad, el riesgo de sufrir un IAM se hace mayor. Por su parte, la población de individuos que han padecido ACV y TVP, presentaron una edad promedio menor o muy similar ($33,44 \pm 14,62$ y $40,99 \pm 14,97$ respectivamente) a la de los individuos controles, por lo cual no se observó correlación.

Con respecto al género como otro de los factores de riesgo estudiados, se observó que en los pacientes con infarto, el mayor porcentaje lo representó el género masculino, constituyendo el 82,77% de la población. En consecuencia, se observó una asociación significativa entre la presencia del género masculino y el IAM. Estos resultados concuerdan con los presentados por otros autores, ya que se ha reportado que la mayor incidencia de infarto la presentan los hombres, con 60 individuos afectados por cada 10.000 hombres, entre los 55 y 59 años de edad (Doggen y col., 1998).

La etiología del IAM es diferente en mujeres que en hombres, esto es debido a que el género femenino está sujeto a una protección estrogénica en la edad fértil, por lo que generalmente las mujeres están protegidas de las enfermedades del corazón hasta la menopausia, que es cuando el riesgo comienza a aumentar, siendo similar en mujeres de 55 años al de los hombres que son diez años más jóvenes. Se observó que en la población de individuos que han sufrido TVP, el mayor porcentaje lo representó el género femenino, constituyendo el 82,76% de la población. Esto puede estar vinculado a que se ha reportado que el tratamiento anticonceptivo hormonal oral incrementa el riesgo de enfermedad trombotica venosa, al producir un aumento del fibrinógeno y de los factores II, VII, IX, X, proteínas C y S y la AT-III, generando la formación de trombos (Anderson y Weitz, 2010).

La hipertensión por su parte, que se reportó como variable significativa en el análisis de regresión logístico, se encontraba presente en un 75,75% de la población de pacientes que han sufrido IAM. Este parámetro también aumenta la resistencia periférica y la probabilidad de inducir disfunción endotelial y aterosclerosis como resultado del estrés de cizalladura del flujo sanguíneo sobre el endotelio. Así mismo, una vez formada la placa aterosclerótica, el aumento de la presión sanguínea, la viscosidad, y la estenosis, incrementan el estrés de cizalladura local, lo que se traduce en la ruptura de la placa y la formación del trombo (Vaquero, 2004).

Finalmente, es importante destacar al hábito tabáquico como factor de riesgo, el cual fue correlacionado positivamente con los individuos de la población IAM, en los cuales se observó que el 73,4% de la población de individuos presentaron este hábito. El tabaquismo tiene un impacto mayor sobre los eventos coronarios agudos, a saber los mecanismos involuntarios incluyen: trombosis, disfunción endotelial e inflamación. Los tres componentes del humo del

cigarrillo que parecen contribuir a la enfermedad cardiovascular son la nicotina, el monóxido de carbono y los gases oxidantes (Benowitz y Gourlay, 1997).

El tabaquismo aumenta el riesgo de desarrollar un evento cardíaco. Además este hábito favorece el desarrollo de la placa aterosclerótica durante el período inicial del crecimiento de ésta, y luego influiría en la ruptura de placa y la formación del trombo. Además, la nicotina aumenta la secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), lo cual conduce a un aumento del trabajo y de la frecuencia del corazón y eleva la tensión arterial. Por su parte, el monóxido de carbono se une rápidamente a la hemoglobina y de este modo, reduce la cantidad de hemoglobina disponible para transportar oxígeno e impide su liberación a los tejidos. Esto provoca un estado de hipoxia relativa y un incremento en el número de glóbulos rojos, que contribuye a un aumento en la viscosidad sanguínea, y por consiguiente al estado de hipercoagulabilidad observado en los fumadores (Benowitz y Gourlay, 1997).

Además, varios estudios han reportado fuertes asociaciones positivas entre las concentraciones del FVIIc plasmático y el triacilgliserol (TAG). Se propone que este efecto se debe, al menos, en parte a la capacidad de las lipoproteínas ricas en TAG para promover la división del zimógeno inactivo de cadena sencilla de FVII al FVIIa (Roche y col., 2000).

Se ha sugerido que el FVII se une a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las cuales se encuentran constituidas aproximadamente de 43-74% de triglicéridos y un 9-23% de colesterol, los cuales prolongan su vida media y a su vez, genera que pequeñas cantidades de FVII se conviertan en FVIIa a través del contacto con la superficie. Además, se ha demostrado que un aumento postprandial en el FVIIc no está asociado con un aumento en el FVIIag (Saha y col., 1994).

En un estudio realizado por Saha y colaboradores, en el año 1994 se concluyó que el alelo A del polimorfismo g.10976 G>A presenta una influencia sobre la activación del FVIIc plasmático. En este estudio se sugirió que la adición de VLDL provoca un rápido aumento de la actividad del FVIIc en los individuos que presentaban al menos uno de los alelos mutado, lo que ha sido interpretado como un aumento de la conversión del FVII zimógeno a FVIIa, que puede sugerir que el cambio del aminoácido genere una mejor interacción de la proteína con este tipo de lipoproteínas generando mayor activación del FVII.

En estudios *in vitro* realizados, en sistemas de plasma purificado, también han sugerido que las lipoproteínas tales como los quilomicrones y VLDL, con densidad suficiente de carga negativa, promueve la activación por contacto de la vía intrínseca de la coagulación y. por lo tanto, del FVII de la coagulación (Saha y col., 1994).

Sin embargo, es importante mencionar que se ha sugerido que el papel central del FXII en las interacciones entre las lipoproteínas ricas en triglicéridos y la vía intrínseca de la coagulación, que pueden conllevar a la activación del FVII. Esto se basa únicamente en estudios *in vitro* en sistemas de plasma purificado, mejorando el proceso de activación (Saha y col., 1994).

Por lo anteriormente expuesto, se puede sugerir que los individuos analizados en nuestro estudio, que presentan el alelo mutado A y tengan hábitos alimenticios ricos en colesterol y triglicéridos, podrían estar predispuestos a la activación del FVII sin que ocurra la unión con el FT, debido a que la mutación puede generar mayor interacción entre este grupo de lípidos y la proteína, conllevando a la activación de la misma. Aunque en varios estudios se ha reportado la disminución de la secreción del FVII, si existe gran cantidad de este tipo de lipoproteínas, la activación del FVII aumentará y generará como consecuencia la activación del proceso de

coagulación sanguínea y así la formación de trombos sin daño en el endotelio. En investigaciones futuras será necesario medir el nivel de colesterol en la población de estudio para determinar si existe una correlación entre este tipo de lípido y la presencia del alelo A del polimorfismo g.10976 G>A en el desarrollo de patologías coronarias como el IAM.

Finalmente, cabe destacar que los resultados obtenidos en este trabajo, en relación al polimorfismo g.10976 G>A, son reportados por primera vez en Venezuela y representan un aporte importante dentro de los distintos factores de riesgo que pueden influir a la predisposición de patologías trombóticas arteriales dentro de la población venezolana. Además, este tipo de investigaciones permite generar un mayor conocimiento sobre las diferencias entre la variaciones genéticas presentes en nuestro país en comparación con distintas partes del mundo.

VII. CONCLUSIONES

1. Se observó que el grupo de pacientes que han sufrido IAM presentó una edad promedio mayor, un porcentaje más alto de fumadores, un mayor porcentaje de individuos del género masculino, y un mayor porcentaje de individuos que presentación diabetes mellitus e hipertensión arterial.
2. Se determinó que el grupo de pacientes infartados es 1,92 veces más probable la presencia del alelo A del polimorfismo g.10976 G>A que el grupo de individuos controles, sugiriendo que dicho alelo pudiera estar asociado con el desarrollo del IAM en el grupo estudiado.
3. Se determinó una correlación positiva entre las variables edad, sexo masculino, hipertensión arterial y hábito tabáquico con la presencia de IAM. Además se encontró una correlación positiva entre la variable sexo femenino y la presencia de TVP, mediante un análisis de regresión logístico.
4. No se determinó ninguna correlación positiva entre las variables sexo, hipertensión arterial, hábito tabáquico y la presencia de ACV.

5. Según los resultados obtenidos en este trabajo, la presencia en conjunto de los factores ambientales tales como edad, sexo, hipertensión arterial, hábito tabáquico, simultáneo con la presencia del alelo A del polimorfismo g.10976 G>A en el gen que codifica para el factor VII de la coagulación sanguínea, puede ser considerado como un factor predictivo para la presencia de IAM.

VIII.RECOMENDACIONES

Es importante recomendar la continuación de los estudios epidemiológicos, ya que permiten evidenciar la relación causa-efecto entre la exposición de distintos factores de riesgo que influyen en la mortalidad y en la morbilidad, bien sean factores de riesgo ambientales o genéticos en las enfermedades trombóticas. Los métodos epidemiológicos han sido cruciales para identificar numerosos factores de riesgo que, a su vez, han logrado la prevención de enfermedades, lesiones y muertes prematuras.

Se recomienda el aumento del *n* poblacional en el grupo de individuos que han padecido de ACV, para lograr obtener un mejor resultado con una mayor significancia estadística en la asociación entre el genotipo del polimorfismo g.10976 G>A y la patología.

Se recomienda incluir en la encuesta de datos requeridos al paciente si el tipo de consumo de alimento es rico en grasa así como el uso de anticonceptivos.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anand, S., Xie, C., Paré, G.; Montpetit, A., Rangarajan, S., McQueen, M., Cordell, H. y colaboradores. (2009). Genetic variants associated with myocardial infarction risk factors in over 8000 individuals from five ethnic groups. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2:16-25.
- Anderson J. y Weitz J. Hipercoagulable State. (2010) *Clin Chest Med.* 3:659-73.
- Ardissino D., MannucciP., Merlini P., Duca F., Fetiveau R., Tagliabue L., Tubaro M., Galvani M., Ottani F., Ferrario M., Corral J. y Margaglione M. (1999). Prothrombotic Genetic Risk Factors in Young Survivors of Myocardial Infarction. *Blood.* **94**: 46-51.
- Benowitz N. y Gourlay S. (1997). Cardiovascular toxicity of nicotine. *J Am Coll Cardiol.* **29**:1422-1431.
- Bhatt, D.; P. Steg; E. Ohman; A. Hirsch; Y. Ikeda; J. Mas; S. Goto; C. Liao; A. Richard; J. Rother; P. Wilson. (2006). International Prevalence, Recognition, and Treatment of Cardiovascular Risk Factors in Outpatients With Atherothrombosis. *JAMA* **295**:180-189.
- Benitez C., Benitez L., Arigossi C. y Benitez A. (2004). *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina.* **140**:6-9.
- Bowen D. y Keeney S. (2003). Unleashing the LD-PCR for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia A. *Thromb Haemost.* **89**:201-202
- Bulla L. 1998. Regresión Logística. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Caracas 27pp.
- Cabrera A., Hernández G., López D., Narváez P., Aguilar F., Gaytan L., Ortiz M., Mitre P., Rangel S. (2010). Riesgo de enfermedad tromboembólica venosa en pacientes con enfermedad aguda internados en urgencias. *Med Int Mex.* **26**:31-35.

- Ciruzzi M, Pramparo P, Rozlosnik J. On behalf of the Argentine FRICAS (Factores de Riesgo Coronario en América del Sur). (2001). Hypertension and the Risk of Acute Myocardial Infarction in Argentina. *Prev Cardiol.* **4**:57-64.
- Collados M., (2002) Patologías Cardiovasculares. *Transferencia.* **59**.
- Dickison C., Kelly C., y Ruf W. (1996). Identification of surface residues mediating tissue factor binding and catalytic function of the serine protease factor VIIa. *Biochemistry.* **93**:1437-14384.
- Doggen C., Manger V., Bertina R. y Rosendaal F. (1998). Interaction of Coagulation Defects and Cardiovascular Risk Factors. *Circulation.* **97**:1037-1041.
- Maguire J., Thakkestian A., Sturm J., Levi C., Lincz L., Parsons M., Whyte S. y Attia J. (2008). Polymorphisms in Platelet Glycoprotein 1b α and Factor VII and Risk of Ischemic Stroke. *Stroke.* **39**:1710-1716.
- Monroe D. M. y M. Hoffman (2006). What does it takes the perfect clot. *Arterioscl Thromb Vas.* **26**:41-48.
- Elhasade, A.; A. Perkowska-Francka; J. Szmidt; Z. Gaciong. (1998). Physiology of fibrinolysis. *Medical Science Monitor* **4**:555-563.
- Endler G., Mannhalter C., (2003). Polymorphism in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis, *Clin Chim Acta.* **330**: 31-55.
- Franchini M., Mannucci P., (2009). Multiple gene interaction and modulation of hemostatic balance. *Clin Chem Lab Med.* **12**:1455–1460.
- Furie B., (2009). Pathogenesis of thrombosis. *Hematology.* **1**:255-258.

- Funk M., Endler G., Lalouschek W., Hsieh K., Schillinge M., Lang W. y Mannhalter C., (2006). Factor VII and Haplotypes and risk of ischemic stroke. *Clin Chem.* **52**:1990-1992.
- Ghaddar H., Folsom A., Aleksic N., Hearne L., Chambless L., Morrissey J. y Wu K. (1998) Correlation of Factor VIIa Values With Factor VII Gene Polymorphism, Fasting and Postprandial Triglyceride Levels, and Subclinical Carotid Atherosclerosis. *Circulation* **98**:2815-2821.
- Girelli D., Mannucci P., Bernardi F. and Corrocher R. (2000) Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease. *New Hemostasia y Trombosis Engl J Med.* **343**: 774-780.
- Green F., Kelleher C., Wilkes H., Temple A., Meade T. y Humphries S. (1991). A common genetic polymorphism associated with lower coagulation factor VII levels in healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **11**:540-546.
- Hagen F., Gray C., O'Hara P., Grant P., Saari G., Woodbury R., Hart C., Insley M., Kisiel W., Kurachi K. y Davies I. E. (1986). Characterization of a cDNA coding for human factor VII. *Biochemistry.* **83**:2412-2416.
- Hahn M., Rockman M., Soranzo N., Goldstein D. y Wray G. Population genetic and phylogenetic evidence for positive selection on regulatory mutation at the factor VII locus in humans. *Genetics.* (2004). **167**:867-877.
- Hajjar, K. (2002). Mecanismos Moleculares de la fibrinólisis. Pp. 1479-1493, en: K. Hajjar y H. Claeys. Freeman Inc. 2590 pp.

- Hernández R. (2007). II Norma Venezolana para el tratamiento de la hipertensión arterial. pp 70
- Heywood D., Carter A., Catto A., Bamford J. y Grant P. (1997). Polymorphisms of the Factor VII Gene and Circulating FVII:C Levels in Relation to Acute Cerebrovascular Disease and Poststroke Mortality *Stroke*. **28**:816-821.
- Hoffman M. (2003) A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood*.**17**:51-55.
- Hoffman M. y Monroe D. M. (2001). A Cell-based model of Hemostasis. *Thromb Haemost.* **85**:958-65.
- Humphries S., Lane A., Green F., Cooper J. y Miller G. (1994). Factor VII coagulant activity and antigen levels in healthy men are determined by interaction between factor VII genotype and plasma triglyceride concentration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.**14**:193-198.
- Hunault M., Arbini A., Lopaciuk S., Carew J. y Bauer K. (1997). The Arg³⁵³Gln Polymorphism Reduces the Level of Coagulation Factor VII In Vivo and in Vitro Studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.**17**:2825-2829.
- Iacoviello L., Di Castelnuovo A., Knijff P., D'Orazio A., Amore C., Arboretti R., Kluft C. y colaboradores. (1998) Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *Engl J Med*. **338**:79-85.
- Kameneva M., Garrett K., Watach M. y Borovetz H. (1998) Red blood cell aging and risk of cardiovascular diseases. *Clin Hem and Microcir*.**18**:67-74.

- Kelley R., Yang J., Eigenbrot C., Moran P., Peek M., Lipari M. y Kirchhofer D. (2004). Similar molecular interactions of factor VII and factor VIIa with the tissue factor region that allosterically regulates enzyme activity. *Biochemistry*. **43**: 1223-1229.
- Klug W., Cummings M. y Spencer S. (2006). Conceptos de genética. Pearson Prentice Hall. Octava Edición. Madrid, España.
- Lane D. y Grant P. (2000). Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood*. **95**:15317-1531.
- Lens, D.; A. Otero; G. Cotic; S. Henry; A. Díaz; D. Attarian; C. Agorio; S. Pierri. (2000). Diagnóstico molecular de factores protrombóticos: primeros casos de factor V Leiden y protrombina 20210A en Uruguay. *Revista Médica del Uruguay* **16**(1):39-44.
- Martinez-Murillo C. y Quintana S. (1996). Manual de Hemostasia y Trombosis. Bases fisiopatológicas y clínicas de la enfermedad hemorrágicas y trombóticas. Editorial Prado. S. A. de C. V. Primera Edición. Ciudad de México, México.
- Mathews, C. K.; Van Hold, K. E.; Ahern, K. G. (2002). Bioquímica. Pearson Educación, S. A., Tercera Edición. Madrid, España.
- Mckenzie S. (1999) Hematología Clínica. Editorial Manual Moderno, S. A. Edición en español. Caracas.
- Miño, P. (2004). Heparinas de bajo peso molecular en la práctica clínica. Editorial Artegráfico C.A. Segunda Edición. Ecuador. 311 pp.
- Moniek P., Green F., Knijff P., Jespersen J. y Kluft C. (1997) Factor VII Polymorphisms in Populations with different risks of cardiovascular disease. *Arterioscl Throm Vas*. **17**:1918-1923

- Mtiraoui. N., Aboud N., Bouraoui H., Haizem S., Gris J., Busson M., Tamim H. y colaboradores. (2005). Reduction in coagulation factor VII plasma levels by R353Q but not the -323P0/10 promoter polymorphism in healthy Tunisians. *Am J Hematol.* **79**:11-16.
- Navarro-López, F. 2002. Bases genéticas de la enfermedad coronaria. *Revista española de cardiología* **55**:413-431.
- Nour M., Belhai F., Maaroufi R., Hammami M y Mahioub T. (2005). FVII polymorphisms associated whit plasma factor VII coagulant activity levels in healthy Tunisians. *Eastern Mediterranean Healrh Journal.* **11**: 102-108
- Ogawa M., Satoshi A., Sadatoshi B., Masahiko S., Takashi K., Shiro S., Tatsuru Ma, Hitoshi T., Hiroyuki T., Yoshihiko A., Yoshifumi T., Shigeki T., Shinichi M., Ikuro M., Chuwa T. (2004). R353Q Polymorphism, Activated Factor VII, and Risk of Premature Myocardial Infarction in Japanese Men. *Circ J.* **68**: 520 –525.
- O'hara P., Grant F., Heldman B., Gray C., Insley M., Hagen F., Y Murray F. (1987). Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, avitamin K-dependent protein participating in blood coagulation Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. *Biochemistry.* **84**:5158-5162.
- Pinotti M., Toso R., Girelli D., Bindini D., Ferraresi P., Papa M., Corrocher R., Marchetti G. y Bernardi F. (2000). Modulation of factor VII levels by intron 7 polymorphisms: population and in vitro studies. *Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology.* **11**: 3423-3428.

- Páramo J., Panizo E., Pegenaute C., Lecumberri R. (2009). Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia. *Rev Med Univ Navarra*. **53**:19-23.
- Pendurthi U., Mohan Rao L. (2008). Factor VIIa Interaction with Tissue Factor and Endothelial Cell Protein C Receptor on Cell Surfaces. *Semin Hematol*. **45**(2 Suppl 1): S21–S24.
- Rasche H. (2001). Haemostasis and thrombosis: an overview. *Eur Heart J Suppl*. **3** (supplQ): Q3-Q7.
- Pinotti M.,Toso R., Girelli D., Bindini D., Ferraresi P., Papa M., Corrocher R., Marchetti G. y Bernardi F. (2000). Modulation of factor VII levels by intron 7 polymorphisms: population and in vitro studies. *Blood*. **11**:3423-3428.
- Roche H., Black I., Noone E., Tully A., Whitehead A. y Gibney G. .(2000). Postprandial factor VII metabolism: the effect of the R353Q and 10 bp polymorphisms. *Bri J Nut*. **83**, 467–472.
- Saha N., Liu Y., Heng C., Hong S., Low S. y Tay J. Association of factor VII genotype with plasma factor VII activity and antigen levels in healthy Indian adults and interaction with triglycerides.(1994). *Arterios Thromb Vasc Bil*.**14**:1923-1927.
- Salas I., Mendoza A., Gutiérrez E. y Borrayo G. (2010). Factores genéticos del sistema hemostático en pacientes jóvenes con infarto agudo del miocardio. *Cir Cir* :**78**:93-97.
- Sambrook J.; Fritsch E.; Maniatis T. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Segunda edición. Estados Unidos.
- Saldaña J. y Urcia L. (2009). Regresión logística aplicada a la epidemiología. *Revista Salud, Sexualidad y Sociedad*. **4**:1-9.

- Shanker J., Perumal G., Maitra A., Rao V., Natesha B., Shibu J., Hebbagodi S. y colaboradores. (2009). Genotype–phenotype relationship of *F7* R353Q polymorphism and plasma factor VII coagulant activity in Asian Indian families predisposed to coronary artery disease. *J Genet.* **88**:291-297.
- Simón, A., A. Castro; J. Kaski. (2001). Avances en el conocimiento de la disfunción endotelial y su aplicación en la práctica clínica. *Revista Española de Cardiología* **54**: 211-217.
- Taroco R., Fernández A., Vales V., Leizagoyen F. y Devoto N. (2009). Accidente cerebrovascular (ACV) isquémico. *Arch Med Interna.* **31**: Supl 1:S34-S45.
- Thrombosis and Vascular Biology italian study group. (2003). No evidence of association between prothrombotic gene polymorphisms and the development of acute myocardial infarction at a young age. *Circulation* **107**:1117-1122.
- Taymaz H., Erarslan S., Toksoy O. ner E., Alkan T., Ağırbaşlı M. y Kirdar B. (2007). Sequence variations within the genes related to hemostatic imbalance and their impact on coronary artery disease in Turkish population. *Thromb Res.* **119**: 55-62.
- Urda T., Zafra J., Caballero J. (1998). Actuación sobre los factores de riesgo cardiovascular encardiopatías isquémicas. Artículo de Colaboración. Hospital San Juan de la Cruz y Hospital de la Axarquía. Velez-Malaga. 9pp.
- Van't Hoof M., Silveira A., Tornvall P., Iliadou A., Ehrenborg E., Eriksson P. y Hamsten A. (1999). Two common functional polymorphism in the promoter region of the coagulation factor VII gene determining plasma factor VII activity and mass concentration. *Blood*, **93**: 3432-3441.
- Vaquero C. (2004). Aterotrombosis. *Anales de Cirugía Cardíaca y Vascular.* **10**:314-328

- Verhamme P. y Hoylaerts M. (2009). Hemostasis and inflammation: two of a kind. *Throm J.* 2009, **7**:15.
- Wu A. y Tsongalis G. (2001). Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases. *Am J Cardiol.* **87**:1361–1366.
- Ziegler A, Van Steen K y Wellek S. (2010). Investigating Hardy equilibrium in case-control or cohort studies or meta-analysis. *Bresat Cnacer Res Treat.* **117**:675-677.

X. ANEXOS

CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN

(Hoja 1 de 3)

Título del Estudio: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A LA TROMBOSIS ARTERIAL Y VENOSA

Objetivos de la investigación:

Usted está invitado a participar, donando una muestra de su sangre, en un estudio donde mediante análisis genéticos y bioquímicos se detectará la presencia de alteraciones que pudieran estar afectando la coagulación de su sangre y en consecuencia promover la formación de coágulos o trombos en arterias y/o venas ocasionando las enfermedades conocidas como trombosis arterial y venosa, respectivamente.

Procedimientos:

El estudio tendrá una duración de tres años. Si usted acepta participar necesitaremos:

1. De una muestra de sangre (20 cc).
2. Que le suministre al médico tratante la información requerida para rellenar la historia médica.
3. Que podamos contactarlo en caso de requerir una segunda muestra o datos adicionales que complementen dicho estudio.

Con su muestra de sangre se procederá única y exclusivamente al análisis genético y bioquímico que permitan determinar si usted posee algunas de las alteraciones genéticas conocidas que causan las enfermedades antes mencionadas. Los análisis genéticos serán realizados mediante técnicas de biología molecular que permitan identificar las alteraciones en aquellos genes relacionados con la coagulación y los bioquímicos mediante ensayos que permitan determinar la funcionalidad y niveles de las diferentes proteínas involucradas en dicho proceso. Las muestras serán almacenadas en Laboratorio de Genética Molecular Humana bajo la responsabilidad de la Dra. Antonietta Porco y el resto de la muestra será conservada hasta finalizar la investigación después de la cual será desechada.

Importancia y beneficios de su participación:

Mediante este estudio, que podrá realizarse gracias a su valiosa colaboración con sólo proporcionar una muestra de su sangre, se podrá avanzar en el entendimiento de las causas de la trombosis arterial o venosa lo cual permitirá la aplicación, por parte del médico responsable, de tratamientos más efectivos para su mejoría. Además, permitirá aplicar los correctivos necesarios para evitar que sufra complicaciones en un futuro. Conjuntamente con

CONFIDENCIAL

CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN (continuación)

(Hoja 2 de 3)

los beneficios mencionados anteriormente que podrá proporcionarle a corto plazo este estudio, los resultados obtenidos con su muestra a su vez permitirán obtener datos que serán utilizados para establecer una estadística de las causas de la enfermedad vascular en nuestro país. Los resultados obtenidos una vez finalizado este estudio serán publicados en revistas científicas especializadas.

Riesgos:

Su participación no implica riesgo ni inconveniente para su salud ni la de sus familiares.

Confidencialidad:

Todos los datos obtenidos de la investigación serán mantenidos en absoluto secreto y toda la información sobre su persona será solo accesible a los investigadores y médicos involucrados en el estudio. Su identidad no será hecha pública en ninguno de los manuscritos científicos o en las presentaciones que se realicen en eventos científicos.

Derecho a negarse a participar:

La participación en este estudio es voluntaria. Usted puede negarse a participar en el estudio o interrumpir su participación en cualquier momento. Si usted se niega a participar en el estudio, esto no afectará el tipo de atención que recibirá por parte de su médico.

Preguntas:

Debido a que se utilizaron algunos términos técnicos en este formulario de consentimiento, si existe algo que usted no entienda, por favor pregunte sobre esto sin dudarlo.

Por favor tome su decisión de participar en este estudio sólo después de haber examinado detenidamente el contenido de este formulario. En caso de emergencia o que tenga cualquier pregunta, en cualquier momento sobre el estudio por favor contacte al investigador principal:

Investigador Principal: Centro de Investigación:

Antonietta Porco G. Laboratorio de Genética
0412 9525180 Molecular Humana
aporco@usb.ve Universidad Simón Bolívar
0212 9064214

Médico Responsable: Hospital Dr. Miguel Pérez

Susana Blanco **Carreño**

0412 3331425 La vuelta del Pescozónssobrino@
cantv.net Antimano

0212 4728474

Consentimiento:

Yo, _____ portador(a) de la cédula de identidad
_____ he sido informado(a) de manera amplia, clara y
sencilla y mis preguntas han sido contestadas en relación al
estudio sobre el "DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS
ASOCIADOS A LA TROMBOSIS ARTERIAL Y VENOSA", que se llevará a cabo
en forma conjunta entre el Laboratorio de Genética Molecular Humana
de la Universidad Simón Bolívar (USB), el Hospital Dr. Miguel Pérez
Carreño (IVSS), el Banco Municipal de Sangre(MSDS) y el Instituto
de Investigaciones Científicas (IVIC), coordinado por la Dra.
Antonietta Porco y por lo tanto manifiesto estar de acuerdo en
participar en él, por lo que autorizo me sean tomadas las muestras
sanguíneas necesarias para tal fin. He recibido una copia de este
consentimiento.

Nombre y apellido: _____

Firma: _____

Fecha: / /

Firma del investigador

principal

Testigos:

Nombre y apellido C.I. Firma

1.

2.