



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
NICARAGUA,  
MANAGUA  
UNAN - MANAGUA



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD  
“LUIS FELIPE MONCADA”  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO**

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN  
BIOANÁLISIS CLÍNICO**

---

*Estandarización de la técnica molecular PCR-RFLP para la detección del Factor V Leiden (polimorfismo G1691A) en pacientes con trombosis venosa atendidos en el Hospital Escuela “Roberto Calderón”, Managua, julio-septiembre de 2017.*

**AUTORES:**

*Br. Luvy Fidelina Montealegre Roberts.*

*Br. William Antonio Ruiz Rodríguez.*

**TUTOR CIENTÍFICO:**

*PhD. Allan Xavier Pernudi Ubau.*

**ASESOR METODOLÓGICO:**

*MSc. Luis Alfonso Sotelo Reyes.*

*Enero de 2018.*

*“Son los que anhelan aprender quienes heredarán el futuro.  
Aquellos que ya lo saben todo,  
se encuentran equipados solo para vivir en un mundo que ya no existe.”  
Eric Hoffer*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	iii
ACRÒNIMOS Y ABREVIATURAS.....	iv
RESUMEN .....	v
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
3. JUSTIFICACIÓN .....	5
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	6
5. PREGUNTAS DIRECTRICES .....	7
6. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	8
6.1. Objetivo general.....	8
6.2. Objetivos específicos .....	8
7. MARCO TEÓRICO.....	9
7.1. Mecanismo de activación de la coagulación.....	9
7.1.1. Hemostasia primaria .....	9
7.1.2. Hemostasia secundaria.....	10
7.2. Mecanismos de control de la coagulación .....	13
7.2.1. Proteína C.....	13
7.2.2. Proteína S .....	15
7.3. Estados de hipercoagulabilidad: Trombofilias.....	15
7.3.1. Factor V Leiden (polimorfismo G1691A) .....	16
7.3.1.1. Epidemiología .....	20
7.3.1.2. Patología asociada al FVL: Trombosis venosa.....	21
7.3.1.3. Terapia farmacológica.....	26
7.3.1.4. Detección del FVL utilizando la técnica molecular PCR-RFLP .....	27
8. DISEÑO METODOLÓGICO.....	31
8.1. Tipo de estudio.....	31
8.2. Área de estudio .....	31
8.3. Unidad de análisis .....	31
8.4. Población.....	31
8.5. Muestra .....	31
8.6. Tipo de muestreo.....	31

8.7.	Criterios de inclusión .....	31
8.8.	Criterios de exclusión .....	32
8.9.	Recolección de la información.....	32
8.10.	Instrumentos de recolección de la información .....	32
8.11.	Obtención de muestras y controles.....	33
8.12.	Procesamiento de la información .....	33
8.13.	Procedimiento de referencia .....	33
8.14.	Consideraciones éticas de la investigación.....	33
8.15.	Protocolo estandarizado para la detección del FVL.....	34
8.15.1.	Extracción de ADN.....	34
8.15.2.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	35
8.15.3.	Digestión con enzima de restricción .....	36
8.15.4.	Electroforesis en gel de agarosa.....	37
8.15.5.	Evaluación de parámetros de desempeño de la técnica PCR-RFLP.....	38
8.15.6.	Detección de Factor V Leiden en pacientes con trombosis venosa.....	39
9.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES .....	40
10.	RESULTADOS .....	42
10.1.	Estandarización de Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final para la amplificación del factor V de coagulación. ....	42
10.2.	Estandarización de digestión de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica y electroforesis en gel de agarosa para la detección del FVL.....	43
10.3.	Evaluación de los parámetros de calidad del desempeño de la técnica. ....	45
10.4.	Detección del Factor V Leiden en pacientes con trombosis venosa mediante la técnica molecular estandarizada.....	48
11.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	49
11.1.	Estandarización de Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final para la amplificación del factor V de coagulación. ....	49
11.2.	Estandarización de digestión de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica y electroforesis en gel de agarosa para la detección del FVL.....	49
11.3.	Evaluación de los parámetros de calidad del desempeño de la técnica. ....	51
11.4.	Detección del Factor V Leiden en pacientes con trombosis venosa mediante la técnica molecular estandarizada.....	54
12.	CONCLUSIONES.....	58
13.	RECOMENDACIONES .....	59
14.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
15.	ANEXOS.....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

<b>Figura No. 1:</b> Cascada de la coagulación. ....	12
<b>Figura No. 2:</b> Estructura de la Proteína C.....	14
<b>Figura No. 3:</b> Activación de la Proteína C.....	15
<b>Figura No. 4:</b> Acción del factor V normal y del Factor V Leiden.....	19
<b>Figura No. 5:</b> Esquema representativo de la migración de las bandas de ADN mediante electroforesis usando la enzima de restricción <i>Hind III</i> .....	38
<b>Figura No. 6:</b> Ensayo No. 1 para estandarización de PCR punto final para amplificación del gen que codifica para el factor V de coagulación.....	42
<b>Figura No. 7:</b> Ensayo No. 2 para estandarización de digestión de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica y electroforesis en gel de agarosa para la detección del FVL. ....	43
<b>Figura No. 8:</b> Ensayo No. 3 para estandarización de digestión de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica y electroforesis en gel de agarosa para la detección del FVL.. ....	44
<b>Figura No. 9:</b> Ensayo No. 4 para estandarización de la electroforesis en gel de agarosa para la detección del FVL.....	44
<b>Figura No. 10:</b> Ensayo No. 5 para evaluación de la especificidad... ..	45
<b>Figura No. 11:</b> Ensayo No. 6 para evaluación de la sensibilidad... ..	46
<b>Figura No. 12:</b> Ensayo No. 7 para evaluación del límite de detección.....	46
<b>Figura No. 13:</b> Ensayo No. 8 para evaluación de repetibilidad... ..	47
<b>Figura No. 14:</b> Ensayo No. 9 para evaluación de reproducibilidad.....	47
<b>Figura No. 15:</b> Ensayo No. 10 para la detección de FVL en pacientes con Trombosis Venosa Profunda atendidos en el Hospital Escuela “Roberto Calderón” durante el periodo comprendido entre julio a septiembre de 2017... ..	48
<b>Gráfico No. 1:</b> Evaluación de sensibilidad, especificidad, eficacia diagnóstica, falsos positivos y falsos negativos. ....	52
<b>Gráfico No. 2:</b> Evaluación de repetibilidad.. ..	553
<b>Gráfico No. 3:</b> Evaluación de reproducibilidad.. ..	54
<b>Gráfico No. 4:</b> Resultados obtenidos mediante la detección del FVL en pacientes con Trombosis Venosa Profunda atendidos en el Hospital Escuela “Roberto Calderón” durante el periodo comprendido entre julio a septiembre de 2017.. ..	55

## DEDICATORIA

*A mi madre y amiga, **Luvy Normandy Roberts**, la principal cómplice en todos mis proyectos.  
Todo lo que soy es gracias a ella, ha creído en mí, incluso más que yo.  
Este trabajo de investigación también representa su logro.*

*A mi papa y tía, **Freddy** y **Yolanda Montealegre**, así como a mi tío **Guy Roberts**, el apoyo que me brindaron contribuyó al cumplimiento de mis metas académicas.*

*A mi compañero de monografía, **William**, ser la trombina de su Proteína C ha sido uno de mis mayores honores.*

*A **Cindy**, por regalarme momentos que al recordarlos me obligan a sonreír, mis prácticas de profesionalización fueron más alegres cuando las compartí con ella.*

*A quienes tengo la dicha de llamar **amigos**, durante los años que tengo de conocerlos, su compañía y apoyo han aliviado los momentos difíciles por los que he pasado, haciendo más amena mi existencia. Recuerdo que cuando aún no me decidía por qué carrera profesional elegir uno de estos amigos me comentó sobre Bioanálisis Clínico y vaya... ahora mismo estoy a punto de graduarme en esa carrera. Aunque no los nombro para evitar sonrojarlos, espero que si leen esto reconozcan que me refiero a ustedes.*

*A los que utilicen este documento en sus investigaciones, espero se beneficien de su lectura tanto como mi compañero y yo lo hicimos al prepararlo.*

*Con profunda sinceridad: Luvy F. Montealegre Roberts.*

*Dedico este trabajo a esos amigos que nos acompañaron a lo largo de la carrera, a los que nos dejaron por los motivos que fuesen, a esos amigos que hoy ya no son tan amigos y sobre todo a los amigos que sin saberlo se volvieron Polimerasa y Enhancer, pero supieron cuando ser solución stop; Gracias por estar ahí para mí siempre que lo necesité.*

*A mi padre, **William***

*Porque aunque ya no estés físicamente en este mundo tu espíritu y perseverancia siempre estarán conmigo. Gracias a ti puedo decir con orgullo quien soy.*

*A mi madre, **Juana***

*Porque aun en medio de riñas, lágrimas y desesperación fuiste columna en un hogar roto.*

*A mis familiares,*

***Rosmel** y **Valeria** por resistirse a cometer fratricidio. **Rosa, Lesbia** y **Aida** no pude pedir mejores tías. **Carlos, Anielka, Daniela** por ser más que primos, hermanos. Su apoyo y el del resto de la familia tuvo un valor incalculable.*

*A mi mejor amiga, **Ana***

*Por ser la mejor cuando he actuado de lo peor.*

*A todos los que ayudaron de forma directa e indirecta a culminar esta investigación, gracias.*

*Pues está también dedicada a ustedes.*

*William Antonio Ruiz Rodríguez.*

## AGRADECIMIENTOS

*En el momento de llegar al final es cuando uno se da cuenta del camino recorrido, si ha sido largo, difícil, complejo, si ha habido buenos ratos o si ha merecido la pena; pero sobretodo es cuando uno no puede dejar de recordar a todas esas personas que le han ayudado a recorrerlo hasta llegar a buen puerto. Por ello, queremos ofrecer unas líneas a algunas de estas personas.*

*Sin duda olvidaremos otras, pero a todas ellas gracias, por siempre gracias.*

*A nuestros **padres** y demás **familiares**, pues gracias a sus invaluables sacrificios hemos podido alcanzar los objetivos propuestos en este tramo de vida.*

*Al **Instituto Politécnico de la Salud**, especialmente al **Departamento de Bioanálisis Clínico**, por habernos brindado un espacio para nuestra formación como profesionales de la salud.*

*A nuestro tutor **PhD. Allan Pernudi**, por darnos la oportunidad de realizar este trabajo final de graduación bajo su dirección. Su apoyo y capacidad para guiar nuestras ideas fue un aporte invaluable, no solo en el desarrollo de este trabajo, sino también en nuestra formación como investigadores.*

*A nuestro asesor metodológico **MSc. Luis Sotelo**, quien con disposición, paciencia y esmero nos proporcionó los aportes necesarios para la realización de este trabajo.*

*Gracias por confiar en nosotros.*

*A la **Lic. Kenia García**, del Laboratorio de Biología Molecular “Elmer Cisneros” in memoriam, estamos seguros que con nosotros hizo tanto como lo hubiese hecho un tercer integrante en nuestra monografía, de ella aprendimos acerca del trabajo en equipo entre bioanalistas y nuestros hermanos profesionales, los microbiólogos. Infinitas gracias por sus largas horas de trabajo en el laboratorio a nuestro lado. Igualmente, le agradecemos porque ella junto con **MSc. Martha Guerrero** y **MSc. Soledad Mendoza** apoyaron nuestra participación en JUDC-POLISAL al prestarse a leer nuestro protocolo de investigación y sugerir recomendaciones para la mejora del mismo. A las tres, gracias por creer que lo podríamos lograr.*

*A **Alexander Estrada**, médico residente de la sala de Medicina Interna de Varones del Hospital Escuela “Roberto Calderón”, Managua, la colaboración obtenida de su parte en la selección de la población estudiada es un ejemplo de los beneficios del trabajo interdisciplinario para la mejora de la calidad de vida de nuestros pacientes.*

*Al **Dr. Carlos Santamaría**, del Hospital Nacional del Niño “Dr. Carlos Sáenz Herrera”, Costa Rica, por suministrarnos los controles necesarios para la estandarización de la técnica.*

*A cada uno de los **21 pacientes de la sección de anticoagulados del Hospital Escuela “Roberto Calderón”**, Managua, quienes al aceptar participar en este estudio hicieron posible la materialización de este trabajo monográfico.*

*Sin ellos, este trabajo no hubiese sido posible.*

## ACRÒNIMOS Y ABREVIATURAS

<b>ACO:</b>	Anticoagulante Oral
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNpol:</b>	ADN polimerasa
<b>Arg:</b>	Arginina
<b>bp:</b>	pares de bases
<b>CN</b>	Control Negativo
<b>CNM</b>	Control No Mutado
<b>CP</b>	Control Positivo
<b>Cys:</b>	Cistina
<b>dNTPs:</b>	Desoxirribonucleótidos
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>EP:</b>	Embolismo Pulmonar
<b>FV:</b>	Factor V
<b>FVa</b>	Factor V activado
<b>FVL:</b>	Factor V Leiden
<b>HBPM:</b>	Heparina de Bajo Peso Molecular
<b>HNF:</b>	Heparina No Fraccionada
<b>INR:</b>	Razón Normalizada Internacional
<b>Lys:</b>	Lisina
<b>PC:</b>	Proteína C
<b>PCa:</b>	Proteína C activada
<b>PCR:</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PGR:</b>	Pérdida Gestacional Recurrente
<b>PS:</b>	Proteína S
<b>Px</b>	Paciente
<b>RFLP:</b>	Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica
<b>RPM</b>	Revoluciones Por Minuto
<b>SNP:</b>	Polimorfismo de un Solo Nucleótido
<b>SPT:</b>	Síndrome Post Trombótico
<b>TEV:</b>	Tromboembolismo Venoso
<b>TVP:</b>	Trombosis Venosa Profunda
<b>TVPR:</b>	Trombosis Venosa Profunda Recurrente

## RESUMEN

El Factor V Leiden (FVL), constituye la más común de las trombofilias hereditarias, ocurre por la sustitución de una guanina por una adenina en el nucleótido 1691 del gen que codifica para el factor V de coagulación, esto ocasiona el reemplazo del aminoácido 506 de una arginina por una glutamina, impidiendo que la inactivación del factor V se realice eficientemente. Este trabajo monográfico tuvo el objetivo de estandarizar la técnica molecular PCR-RFLP para la detección del FVL en pacientes con trombosis venosa atendidos en el Hospital Escuela “Roberto Calderón”, Managua, julio-septiembre de 2017. El estudio fue cuasi-experimental, exploratorio, de corte transversal, la población estuvo conformada por 74 pacientes con diagnóstico de trombosis venosa atendidos en el Hospital Escuela “Roberto Calderón” durante el periodo en estudio, la muestra fueron 21 pacientes diagnosticados con Trombosis Venosa Profunda de origen idiopática, correspondiente al 28,4% de la población. Se estableció el protocolo de PCR punto final para amplificar el factor V de coagulación y el protocolo de digestión de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica y electroforesis en gel de agarosa para la detección del FVL. La técnica obtuvo 100% de especificidad, sensibilidad, eficacia diagnóstica, repetibilidad y reproducibilidad. No fue posible determinar el límite de detección. Se detectó FVL en un 14.3% de los pacientes estudiados, todos con genotipo heterocigoto, el 85.7% no presentó FVL. Se recomienda seguir promoviendo la investigación en el campo de la biología molecular aplicada a la hematología, incorporar la técnica estandarizada dentro de las pruebas moleculares disponibles para el público y dar el manejo terapéutico necesario a los pacientes diagnosticados con FVL en esta investigación.

**Palabras claves:** *Factor V Leiden, trombosis venosa, estandarización, PCR-RFLP.*

## **1. INTRODUCCIÓN**

La hemostasia incluye una serie de interacciones entre endotelio, plaquetas y factores de coagulación las cuales son necesarias para formar y remover coágulos ante un daño vascular. Dichas interacciones estas reguladas por un delicado balance entre mecanismos procoagulantes, que favorecen la hemostasia y mecanismos anticoagulantes, que previenen la activación de la coagulación. Si se altera este equilibrio a favor del estado procoagulante se genera lo que se denomina hipercoagulabilidad (Zafra, 2011).

A nivel mundial, durante las últimas décadas se han identificado varios factores genéticos que predisponen a la trombosis, sólo dos de ellos han sido ampliamente estudiados: el Factor V Leiden (G1691A) y la mutación de la protrombina (G20210A). A principios de la década de 1990 se estudiaron tres familias con trombosis venosa asociada a resistencia a la Proteína C activada (PCa) y en 1994 el defecto genético responsable descrito como una mutación puntual en el gen que codifica para el factor V (FV) se denominó Factor V Leiden, debido a la ciudad de Holanda en la cual fue descubierto por Bertina y su grupo de colaboradores (Zabalegui, 2000).

El FVL es la alteración genética que origina que el FV activado permanezca resistente a la acción proteolítica de la PCa, lo cual incrementa anormalmente la generación de trombina y provoca un estado de hipercoagulabilidad, que puede llevar a trombosis venosa, con posibilidad de desarrollar otros padecimientos como Síndrome Post Trombótico (SPT), Trombosis Venosa Profunda Recurrente (TVPR), Embolia Pulmonar (EP) y complicaciones gestacionales (García, 2011).

La prevalencia del FVL entre la población sana varía en función del grupo étnico y del área geográfica considerada, la raza caucásica parece ser de las más afectadas, pues registra entre un 3-6% de población general como portadora del FVL. No existen datos acerca de la frecuencia de esta alteración genética en la población nicaragüense. Ahora bien, la prevalencia del FVL entre pacientes con trombosis venosa oscila entre el 20-40%. En individuos heterocigotos el riesgo trombótico se incrementa hasta ocho veces. En cambio, los portadores homocigotos tienen un riesgo inclusive 80 veces mayor de presentar una trombosis venosa, esto comparado con personas que han desarrollado un evento trombótico, pero con factor V normal (Zabalegui, 2010).

Para la detección del FVL se puede hacer uso de técnicas moleculares tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa - Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (PCR-RFLP), su

uso involucra la amplificación por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final seguida por la detección del cambio de base en el ADN mediante digestión con enzima de restricción y finalmente la visualización de bandas de ADN por medio de electroforesis en gel. De este modo, es posible determinar la presencia o ausencia de defectos genéticos causantes de trombofilias distinguiendo entre los genotipos homocigoto y heterocigoto.

En Nicaragua, el diagnóstico molecular de las trombofilias de causa genética no se lleva a cabo. Por ello, la ejecución de este trabajo monográfico, proporciona un nuevo panorama para el estudio de trombofilias hereditarias y particularmente para el estudio del FVL en pacientes con historial de eventos trombóticos.

## 2. ANTECEDENTES

El estudio *Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C* por Bertina *et al.* (1994) en Leiden, Holanda, investigó la detección de la sustitución de la guanina por una adenina en la posición 1691 del gen que codifica para el factor V de coagulación en 301 pacientes que habían sufrido episodios de TVP y en 301 individuos controles de la población holandesa. De estos, 64 pacientes y 6 individuos controles presentaban la mutación. La frecuencia alélica de la mutación fue del 21% en los pacientes con TVP y del 2% en los individuos controles.

La investigación *Analytical Evaluation of Primer Engineered Multiplex Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism for Detection of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A* por Huber, McMaster & Voelkerding (2000) en Estados Unidos utilizó 205 muestras de pacientes con trombosis venosa, de estos 139 presentaban el genotipo silvestre, 62 resultaron heterocigotos y 4 homocigotos para el polimorfismo G1691A.

El artículo *Características de la trombosis venosa profunda en pacientes con Factor V Leiden y mutación G20210A del gen de la protrombina* elaborado por Carmona *et al.* (2003) en España obtuvo que de 100 pacientes, 13 eran portadores del FVL y uno de ellos presentó la mutación del gen de la protrombina de forma simultánea. La distribución por sexo muestra una mayor proporción de varones en el grupo de portadores de la anomalía, 15 varones y seis mujeres (2,5:1), frente a 43 varones y 36 mujeres (1,2:1) en el grupo de pacientes sin alteraciones, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Tampoco existen diferencias significativas en cuanto a la edad, se halló una media de 56 años al primer episodio en los pacientes portadores frente a 53 en el grupo de no portadores. El 19% de los pacientes con FVL presentó más de un episodio de TVP, con un intervalo entre episodios de 6,5 años.

La investigación *Factor V Leiden y mutación de la protrombina G20210A en pacientes con trombosis venosa y arterial* hecho por Palomo *et al.* (2005) en Chile estudió 149 pacientes con trombosis diagnosticada en el Hospital Regional de Talca y un grupo control formado por 160 donantes de sangre, los resultados sugieren que la prevalencia de FVL es de 5,4% en pacientes con trombosis y de 1,3% en el grupo control, en ninguno de los grupos estudiados se encontraron individuos homocigotos.

El estudio *Detección de las mutaciones Factor V Leiden y Protrombina G20210A en pacientes con Trombosis Venosa* elaborada por Venegas, Conte & Cuneo (2006) en Chile reveló que de 565 exámenes para la detección del FVL, 35 (6,19%) resultaron ser positivos, 31 con genotipo heterocigoto (5,49 %) y 4 homocigotos (0,71%). De los 471 pacientes a quienes se les estudió tanto FVL como la mutación de la protrombina, ninguno presentaba ambas alteraciones genéticas.

La investigación *Frecuencia de las mutaciones del Factor V Leiden y protrombina G20210A en pacientes con tromboembolismo venoso* realizado por López *et al.* (2007) en Venezuela en 140 sujetos, divididos en un primer grupo (G-I) de 45 pacientes con historia de hipertensión e isquemia miocárdica, el segundo grupo (G-II) de 44 pacientes con historia de trombosis venosa y el tercer grupo (G-III) de 51 individuos controles. La prevalencia del FVL en G-I fue de 6,6%, donde 2,2% fueron homocigotos. En el G-II, 18,2% fueron portadores del FVL, todos heterocigotos. En el G-II un 3,9% presentó heterocigosis para FVL. Los resultados muestran que el FVL es más frecuente en individuos con historial de trombosis venosa.

El trabajo de grado *Análisis mutacional del Factor V Leiden, Protrombina G20210A y Metilentetrahidrofolato Reductasa C677T y A1298C en una muestra de pacientes con susceptibilidad a trombofilia* elaborado por García (2011) en Colombia, estudió 128 pacientes con historia de un evento tromboembólico o pérdida gestacional recurrente y como controles 200 individuos caucásicos, se encontró heterocigocidad para el FVL en el 17% de los pacientes y en el 1.5% de los controles. No se identificaron sujetos homocigotos.

Como resulta evidente a nivel mundial son diversos los estudios que han investigado acerca del FVL, no obstante, en Nicaragua la información publicada al respecto es nula por tratarse este de un estudio sin precedente nacional.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Desde que en 1965 se describió el primer defecto genético causante de trombofilia congénita (déficit de AT III) hasta hoy, el conocimiento sobre estas alteraciones ha aumentado de manera considerable. Desde el punto de vista patogénico las trombofilias genéticas constituyen enfermedades multifactoriales, por lo que el reto actual de la medicina es generar una lista de los factores genéticos y sus mecanismos fisiopatológicos esto para poder analizar cómo contribuyen en el desarrollo de la enfermedad. Durante los últimos años se han identificado varios factores genéticos, entre ellos se encuentra el FVL que predispone a la trombosis venosa, esta última constituye un problema para la salud sobre todo por complicaciones asociadas a Embolismo Pulmonar (Tirado, 2014).

A nivel mundial esta alteración genética se estima hasta en un 40% en pacientes que han presentado eventos de trombosis, esta elevada prevalencia junto con el riesgo trombotico que conllevan, estimado en homocigotos hasta en unas 80 veces y en heterocigotos inclusive 8 veces más que un individuo con factor V normal (Zabalegui, 2010), pone de manifiesto la importancia de este estudio en Nicaragua, pues al ser en el país una investigación sin precedentes se consideró necesario sentar las bases científicas y metodológicas que hicieran posible la estandarización de una técnica que permitiera la detección del FVL.

Ahora bien, la detección del FVL resulta de utilidad puesto que le ofrece al médico la oportunidad de esclarecer eventos de alteraciones de la coagulación relacionados con el desarrollo de trombosis venosa y en donde al FVL se le atribuye ser el factor genético más común en el desarrollo de trombofilias hereditarias. También, la detección del FVL proporciona datos de interés para el manejo terapéutico de los pacientes con el propósito de evitar la aparición de nuevos eventos tromboticos, así como de prevenir el desarrollo de los mismos en aquellos sin historial de la condición clínica asociada al FVL pero que resulten portadores del polimorfismo durante el cribado familiar de individuos sintomáticos (Hernández, Usme & Yunis, 2014).

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Debido a que la condición clínica de trombosis asociada al FVL es causada por el polimorfismo de un solo nucleótido (G1691A), el análisis molecular es considerado un pilar diagnóstico. A pesar de esto, en Nicaragua el estudio de las trombofilias no se lleva a cabo a nivel molecular, mas bien se encuentra limitado al uso de pruebas de coagulación e imagen acompañado de la investigación clínica de signos y síntomas, tal realidad constituyó una necesidad que requería ser resuelta.

En base a lo anteriormente expuesto:

¿Cuál es el protocolo estandarizado de la técnica molecular PCR-RFLP que permite la detección del Factor V Leiden (polimorfismo G1691A) en pacientes con trombosis venosa atendidos en el Hospital Escuela “Roberto Calderón”, Managua, julio-septiembre de 2017?

## 5. PREGUNTAS DIRECTRICES

- 5.1. ¿Cuál es el protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final que debe establecerse para la amplificación del gen que codifica para el factor V de coagulación?
- 5.2. ¿Cuál es el protocolo de digestión de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica y electroforesis en gel de agarosa que debe establecerse para la detección del Factor V Leiden?
- 5.3. ¿Qué resultados se obtienen con la evaluación de los parámetros de calidad del desempeño de la técnica?
- 5.4. ¿Permite la técnica molecular estandarizada la detección del Factor V Leiden en pacientes con trombosis venosa?

## **6. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **6.1. Objetivo general**

Estandarizar la técnica molecular PCR-RFLP para la detección del Factor V Leiden (polimorfismo G1691A) en pacientes con trombosis venosa atendidos en el Hospital Escuela “Roberto Calderón”, Managua, julio-septiembre de 2017.

### **6.2. Objetivos específicos**

- 6.2.1. Establecer el protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final para la amplificación del gen que codifica para el factor V de coagulación.
- 6.2.2. Establecer el protocolo de digestión de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica y electroforesis en gel de agarosa para la detección del Factor V Leiden.
- 6.2.3. Evaluar parámetros de calidad del desempeño de la técnica.
- 6.2.4. Detectar el Factor V Leiden en pacientes con trombosis venosa mediante la técnica molecular estandarizada.

## 7. MARCO TEÓRICO

El mecanismo hemostático es el resultado final de un fino balance entre mecanismos que intentan ocluir las heridas vasculares y mecanismos limitantes de los anteriores. Se han descubierto aproximadamente 50 sustancias que afectan la coagulación de la sangre, las que estimulan la coagulación son llamadas procoagulantes y aquellas que la inhiben se denominan anticoagulantes. Normalmente predominan las sustancias anticoagulantes, pero cuando se rompe un vaso sanguíneo, la actividad de las procoagulantes en la zona lesionada es mucho mayor que la de las anticoagulantes dando lugar a la formación de un coágulo (Zabalegui, 2000).

### 7.1. Mecanismo de activación de la coagulación

Para efectos de aprendizaje la hemostasia se divide en dos, hemostasia primaria y hemostasia secundaria, sin embargo, *in vivo* todos los procesos ocurren al mismo tiempo.

#### 7.1.1. Hemostasia primaria

Es el proceso de formación del tapón plaquetario iniciado ante una lesión vascular, llevándose a cabo una interacción entre endotelio y plaquetas. Normalmente las plaquetas no se adhieren al vaso sanguíneo, esto sólo ocurre cuando existe lesión y se expone al colágeno del subendotelio, permitiendo la activación de las plaquetas (Boza, 2016).

##### 7.1.1.1. Fase vascular

Los vasos sanguíneos se encuentran formados por células endoteliales, membrana basal o subendotelial y la capa muscular. La principal función del endotelio es evitar la trombosis intravascular, esto se logra gracias a que sintetiza proteoglicanos, principalmente sulfato de heparán, que es fuertemente anticoagulante, prostaciclina que es vasodilatador y antiagregante plaquetario, así como trombomodulina que interviene en la inactivación de los factores V y VIII de la coagulación a través de la PCa (Flores, Ramírez, Meza. & Nava, 2014).

##### 7.1.1.2. Fase plaquetaria

Los elementos necesarios en la hemostasia, presentes en las plaquetas, se hallan en sus gránulos densos, alfa y receptores.

- *Adhesión plaquetaria:* ante una lesión vascular, las plaquetas se unen a proteínas adhesivas del subendotelio o tejido perivascular, dicha adhesión depende de receptores específicos para cada proteína presente en la membrana plaquetaria. El colágeno, por ejemplo, se une a la plaqueta mediante la GPIb/IX (Gómez & Pérez, 2012).
- *Activación y segregación:* las plaquetas adoptan forma de esfera con pseudópodos. Simultáneamente, ocurre la secreción plaquetaria de sustancias activadas almacenadas en los gránulos. Algunas de estas sustancias agonistas aceleran la formación del coágulo plaquetario y la reparación tisular. Entre dichas sustancias se encuentran la epinefrina, trombina, adenosin trifosfato y tromboxano A<sub>2</sub>.
- *Agregación:* agonistas estimulan la unión de unas plaquetas con otras, el reclutamiento de más plaquetas y el aumento del tamaño del coágulo el cual se encuentra constituido por una masa de plaquetas degranuladas, empacadas estrechamente y rodeadas de muy poca fibrina. Para la agregación se requiere fibrinógeno y su receptor, GPIIb/IIIa (Zabalegui, 2000).

### **7.1.2. Hemostasia secundaria**

#### **7.1.2.1. Fase plasmática**

Zafra (2011) informa que la coagulación de la sangre es el resultado final de una serie de reacciones complejas (ver Figura No. 1) que abarcan proteínas plasmáticas de tres tipos:

- *Proteínas estructurales:* que pueden modificarse o no a fin de adquirir cierta estructura pertenecen a este grupo el fibrinógeno, el factor von Willebrand y el factor tisular.
- *Cimógenos:* circulan inertes, pero necesitan de otra proteína que las active y en estas condiciones pueden activar a su vez a otra. Se les denomina también proteasas de serina, porque el centro activo es un grupo serina. Pertenecen a este grupo los factores II, VII, IX, X, XI, XII, XIII y la Proteína C (PC).
- *Cofactores:* permiten que una proteína pueda actuar sobre otra. Pueden hallarse activadas o no. También es posible que un cimógeno, en su forma activa actúe de cofactor de otra reacción en la cascada de coagulación. Pertenecen a este grupo los factores V y VIII, Proteína S (PS), activador tisular del plasminógeno, prourocinasa y antitrombina III.

#### 7.1.2.1.1. Activación del factor X de coagulación

- *Vía extrínseca:* es la principal vía de la coagulación sanguínea *in vivo* en respuesta a una lesión. Cuando la sangre es expuesta a extractos tisulares, el factor X es generado rápidamente mediante la interacción del factor VII y el factor tisular. Este último, se encuentra en la submembrana de muchos tejidos del organismo y requiere la destrucción de las células para su liberación. El factor VII realiza la activación del factor X por lo que cuando se da una lesión vascular se libera el factor tisular, que se une al factor VII y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  forman un complejo que activa el factor X el cual ocupa un lugar primordial en la coagulación, pues es el sitio de intersección de ambas vías para continuar a una vía común (Gómez & Pérez, 2012).
- *Vía intrínseca:* es un mecanismo alternativo de activación del sistema de coagulación. Es desencadenado por el contacto de la sangre con una superficie extraña de carga eléctrica negativa, tales como proteínas ajenas al vaso sanguíneo. Hay otros activadores biológicos, como la grasa, la colágena y las endotoxinas. La fase de contacto se inicia con la activación del factor XII que, a su vez, en presencia de la precalicreína y el cimógeno de alto peso molecular actuando como cofactores, activan el factor XI. El factor XIa actúa sobre el factor IX y lo activa. El factor IXa, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfolípidos y el factor VIII activan el factor X y continúan con la vía común (Tirado, 2004).
- *Vía común:* se inicia por la activación del factor X mediante el factor IXa que es capaz de catalizar la conversión del factor X a Xa en presencia del FVIIIa, fosfolípidos y  $\text{Ca}^{2+}$  formando el complejo *tenase* FVIIIa/FIXa. De manera similar, el FXa y el FVa forman el complejo protrombinasa sobre una superficie fosfolipídica en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este complejo cataliza la conversión de la protrombina a trombina (Gómez & Pérez, 2012).

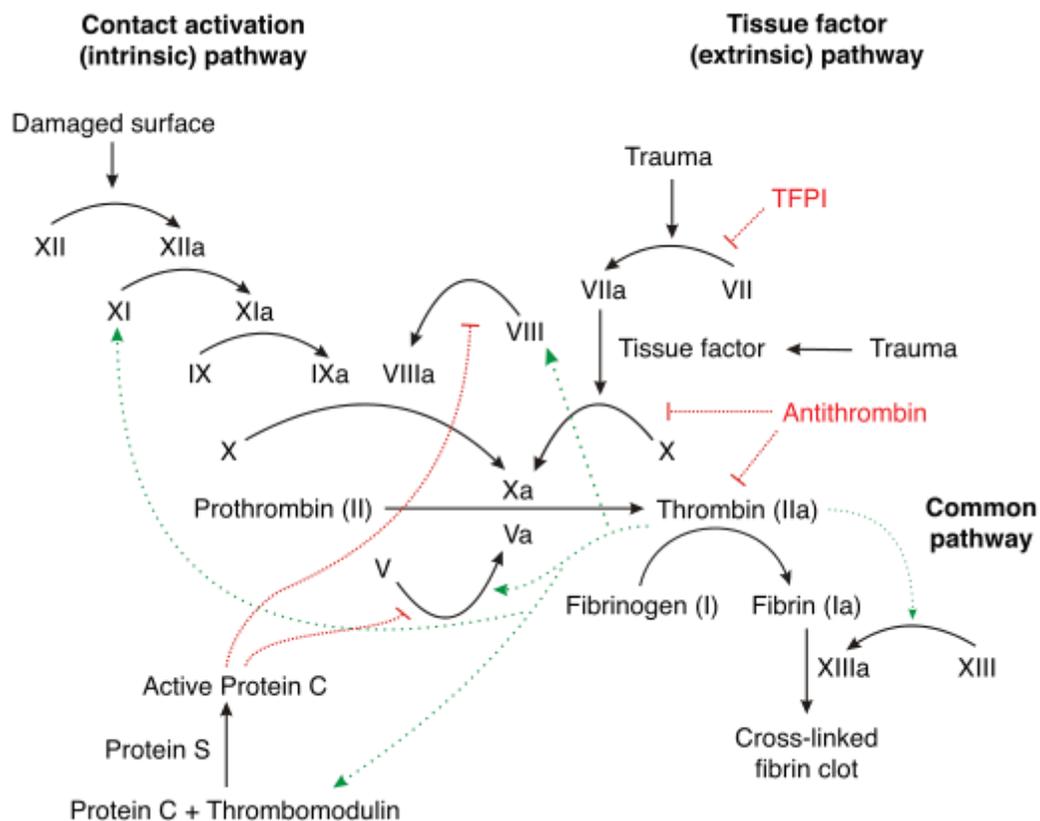
#### 7.1.2.1.2. Generación de trombina

La conversión de la protrombina en trombina es mediada por la acción del factor Xa. Aunque la acción de este factor sobre la protrombina es específica, su velocidad de activación es lenta; sin embargo, se incrementa cientos de veces por la presencia del FV, fosfolípidos y  $\text{Ca}^{2+}$ . A medida que se produce trombina, los mecanismos de la coagulación se amplifican, produciéndose la activación de los factores XII y XI así como la delimitación del proceso hemostático, este

mecanismo lo realiza la trombomodulina, que internaliza la trombina y hace posible la activación de la PC adherida en el endotelio (Zabalegui, 2000).

### 7.1.2.1.3. Formación de fibrina

La trombina actúa sobre el fibrinógeno para formar un coágulo de fibrina. En la formación de la fibrina se distinguen tres pasos: separación de cuatro pequeños péptidos de la molécula del fibrinógeno, polimerización de la fibrina de forma inestable y producción de un polímero de fibrina estable e insoluble para lo que se requiere del factor XIII y  $\text{Ca}^{2+}$  quienes producen enlaces covalentes entre polímeros inestables anteriormente formados (Gómez & Pérez, 2012).



**Figura No. 1: Cascada de la coagulación.** La vía intrínseca se inicia cuando se hace contacto entre la sangre y superficies expuestas cargadas negativamente. La vía extrínseca es desencadenada tras una lesión vascular que conduce a la exposición del factor tisular. Las dos vías convergen en la activación del factor X, que constituye la vía común. El factor Xa hidroliza y activa la protrombina, convirtiéndola en trombina, la cual puede entonces activar los factores XI, VIII y V. Posteriormente, gracias a la acción de la trombomodulina, la PC interactúa con la trombina, utilizando a la PS como cofactor, permitiendo la activación de la PC, tal acción da lugar a la inactivación de los factores Va y VIIIa. Finalmente, el papel de la trombina es convertir el fibrinógeno en fibrina y activar el factor XIII a XIIIa. El factor XIIIa reticula polímeros de fibrina que solidifican el coágulo. **Fuente:** Martínez (2016).

### 7.1.2.2. Fase fibrinolítica

Una vez formado el coágulo estable se desencadena el mecanismo fibrinolítico. El cual es un sistema enzimático, cuya principal función es eliminar el exceso de fibrina del vaso ocluido por un trombo y al mismo tiempo ayudar en la cicatrización vascular. La proteína más importante en este sistema es la plasmina, que es una proteasa de serina liberada por proteólisis de su precursor, el plasminógeno (Tirado, 2004).

## 7.2. Mecanismos de control de la coagulación

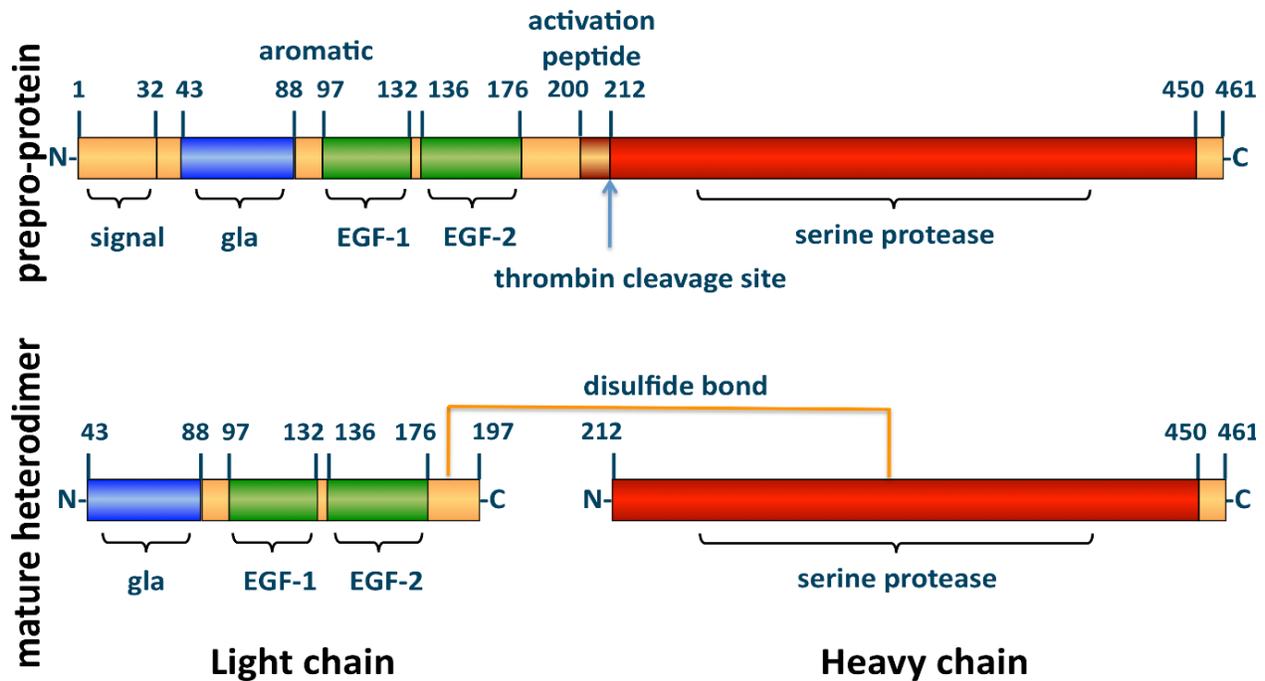
Rubio, Salazar & Nava (2012) indican que la coagulación está delicadamente regulada para mantener la hemostasia, de esto se encargan la trombina que constituye el mayor anticoagulante del organismo, pero también inhibidores de la coagulación como la antitrombina III,  $\alpha$ 2-macroglobulina, inhibidor de la vía del factor tisular, PC y PS. De estos destacan:

### 7.2.1. Proteína C

La PC posee un peso molecular de 62,000 daltons es un zimógeno, dependiente de vitamina K, producido en el hígado, está implicada en un complejo y potente mecanismo anticoagulante conocido como sistema de la PC (Boza, 2016).

La síntesis de PC comienza con una molécula precursora de cadena sencilla, un péptido N-terminal de 32 aminoácidos que precede a una pre-proteína, la PC se forma cuando se elimina un dipéptido de Lys198 y Arg199, lo cual provoca que se transforme en un heterodímero con los hidratos de carbono N ligados a cada cadena. Así la PC queda formada por una cadena ligera de 21,000 daltons (155 aminoácidos) y una cadena pesada de 41,000 daltons (262 aminoácidos) unidas por un enlace disulfuro entre Cys183 y Cys319 (ver Figura No. 2).

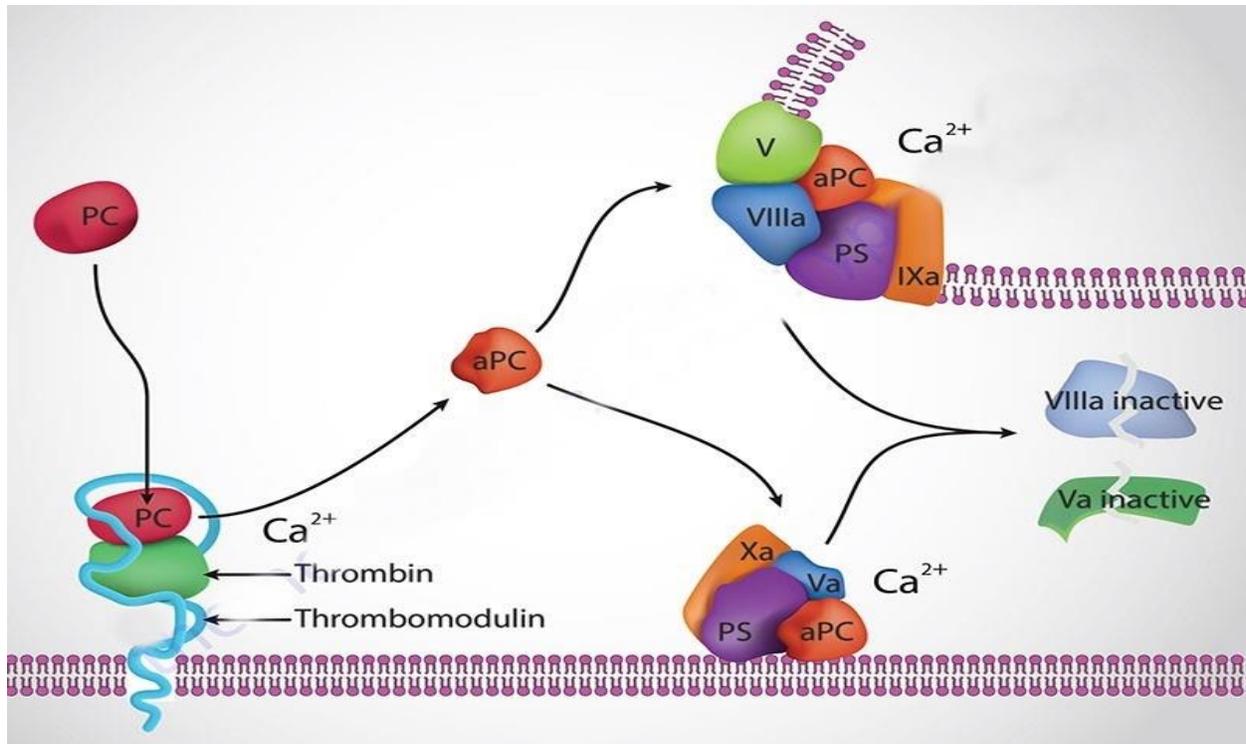
Esta molécula multimodular presenta un módulo rico en ácido  $\gamma$ - carboxiglutámico (Gla), dos módulos similares a los del factor de crecimiento epitelial (EGF) y un módulo serina proteasa. El módulo Gla presenta gran afinidad por los fosfolípidos cargados negativamente, este módulo interactúa con la trombomodulina durante la activación de la PC. Los módulos semejantes al EGF presentan gran afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Zabalegui, 2000).



**Figura No. 2: Estructura de la Proteína C.** Dominio de una pre-proteína C (arriba) y su heterodímero maduro (abajo).  
Fuente: Martínez (2016).

La PC, circula en el torrente sanguíneo como pre-proteína, que se activa sobre la superficie de células endoteliales mediante el complejo formado por la trombina y la trombomodulina, esta última es una proteína multimodular de la membrana endotelial que acelera la activación en varias órdenes de magnitud. La trombina presenta gran afinidad por este receptor de membrana. La activación de la PC también es promovida por el receptor endotelial de la PC (EPCR) este acelera la activación en un factor de 20 (Martínez, 2016). En presencia de la PS, su cofactor, la PCa inactiva directamente a los cofactores procoagulantes Va y VIIIa, al degradarlos por proteólisis, lo cual logra ralentizar la formación de trombina inhibiendo la formación de coágulos innecesarios (ver Figura No. 3).

Al formarse el complejo trombina-trombomodulina, se provoca en primera un cambio en la especificidad por sustrato, seguido de que la trombina pierde sus características procoagulantes. La PCa es altamente específica, ya que no actúa sobre dichos factores en sus formas inactivas. La larga vida media de la PCa y su especificidad por las formas activas de FV y FVIII son requisitos indispensables para el adecuado funcionamiento de la PCa como anticoagulante circulante *in vivo* (Zabalegui, 2000).



**Figura No. 3: Activación de la Proteína C.** La trombomodulina sirve como receptor para la trombina y la PC, permitiendo una interacción entre ambas proteínas. La trombina escinde la PC resultando en su activación. La PCa hidroliza tanto el factor Va como VIIIa haciéndolos inactivos. Esto da lugar a la pérdida de los complejos activos *tenase* y protrombinasa. **Fuente:** The Medical Biochemistry (2017).

### 7.2.2. Proteína S

La PS que en un 40% circula libre es la que posee actividad como cofactor no enzimático (única glicoproteína dependiente de vitamina K que no es una enzima), mientras que el 60% restante está unida a la glicoproteína transportadora de la subunidad C4b del complemento y no participa como cofactor en la actividad anticoagulante. Se sintetiza en las células del endotelio vascular y megacariocitos. Su función consiste en hacer que los factores procoagulantes Va y VIIIa sean más accesibles a la escisión mediada por la PCa. La PCa y la PS libre en su forma de complejo hidrolizan los FVa y FVIIIa, incluso cuando constituyen parte de los complejos *tenase* y protrombinasa, inactivando así la función de cofactor que ejercen sobre los FXa y FIXa e inhibiendo la generación de trombina y con ello la formación de coágulos (Zafra, 2011).

### 7.3. Estados de hipercoagulabilidad: Trombofilias

El estado hipercoagulable representa una alteración de los mecanismos reguladores de la hemostasia que conduce a un predominio patológico de los mecanismos procoagulantes sobre los

anticoagulantes, lo cual lleva al desarrollo de trombosis. El término trombofilia por su parte, define las diversas alteraciones sea hereditarias o adquiridas, cuya presencia predispone a trombosis, esta última, se conceptualiza como la formación de coágulos a partir de sus constituyentes. Las trombosis pueden ser venosas o arteriales. Las alteraciones en factores y cofactores de la coagulación, así como en los inhibidores fisiológicos del sistema hemostático son más comunes como factores de riesgo de la trombosis venosa, este es el caso del FVL, mientras que las alteraciones de tipo plaquetario se asocian más a trombosis arteriales con poca participación de las proteínas de la coagulación (Gómez, Lozano, Alberca, López & Gómez, 2002).

Altuna *et al.* (2012) mencionan que se pueden distinguir dos categorías de trombofilias:

- *Trombofilia adquirida*: constituida por estados de hipercoagulabilidad asociados a circunstancias clínico-patológicas, tales como el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y otras alteraciones de tipo autoinmune que condicionan a un mayor riesgo trombótico.
- *Trombofilia hereditaria*: en donde el trastorno clínico tiene una base genética, es un estado de hipercoagulabilidad primario. La OMS la define como una “tendencia genéticamente determinada al Tromboembolismo Venoso (TEV)”. En la actualidad, la trombofilia hereditaria se considera una enfermedad multifactorial, en donde la interacción de múltiples genes (cada uno de ellos con un efecto variable) con el ambiente, determinaran en cada individuo el grado de susceptibilidad a la trombosis.

Según Roldan (2010), las características de las trombofilias hereditarias son:

- Trombosis venosa (> 90% de los casos).
- Frecuente aparición a edades tempranas (< 45 años).
- Episodios trombóticos a repetición (> 50%).
- Historia familiar de trombosis.
- Localización de trombos en áreas inusuales como la región mesentérica, cerebrovascular o pulmonar.

### 7.3.1. Factor V Leiden (polimorfismo G1691A)

Todos los organismos están sujetos a sufrir cambios en su ADN, esto da lugar a la variabilidad genética dentro de una misma especie. La causa molecular del FVL es una mutación puntual de transición, en la cual se da el cambio de una base nitrogenada por otra de la misma clase, en este

caso ambas purinas (guanina y adenina). En el ADN humano hasta un 99% de las secuencias que contienen a los genes son poco variables dentro de la especie, no obstante, la presencia de formas alélicas diferentes puede llegar a acumularse en las poblaciones hasta que se tornan comunes entre la especie, constituyendo los polimorfismos otra situación, además de las mutaciones, en las que puede haber diversidad genética (Tirado, 2004).

La palabra polimorfismo, está compuesta por *poli* (muchos), *morfo* (forma) e *ismo* (proceso o estado), es decir, de muchas formas. Cuando el alelo de un *locus* en la población presenta una frecuencia de más del 1%, se denomina polimórfico, este porcentaje indica que la presencia de estas variaciones es común, y no se da al azar, puesto que el alelo menos común no puede mantener su frecuencia simplemente por mutación. Esta variación existente entre los miembros de una población da como resultado el hecho de que estos individuos puedan sintetizar proteínas modificadas que tienden a asociarse con diferentes grados de susceptibilidad a padecer alguna enfermedad. Así, cada individuo cuenta con una constitución única genéticamente determinada que le permite responder de manera diferente a la influencia ambiental (Sánchez, Sandoval & Armendáriz, 2013).

Según las características de las secuencias en la que se encuentra el polimorfismo, el FVL, es considerado Polimorfismo de un Solo Nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP), pues está representado por la sustitución de una adenina en vez de la guanina presente en la secuencia nucleotídica normal. De acuerdo con su efecto, el FVL es clasificado como un polimorfismo no silente, debido a que produce una variación en la lectura del código genético, al cambiar el sentido de la traducción de un aminoácido por otro, en este caso, el de la arginina por la glutamina (Sánchez, Sandoval & Armendáriz, 2013).

Por tanto, aunque el término mutación puede ser utilizado para referirse al FVL, este constituye en un sentido estricto, un polimorfismo, debido a que está presente en más del 1% de la población general y su presencia no obliga al individuo a padecer la condición clínica asociada.

El factor V de coagulación (FV) o proacelerina, posee un peso molecular de 330,000 daltons, es un cofactor producido en el hígado, circula libre por el plasma como una cadena polipeptídica simple en una forma procoagulante inactiva. Un 20% del FV es encontrado en las plaquetas. El FV como glicoproteína es codificada en el gen F5 localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (locus 1q23). Tiene un tamaño de aproximadamente 70 kilobases y está constituido por 25 exones

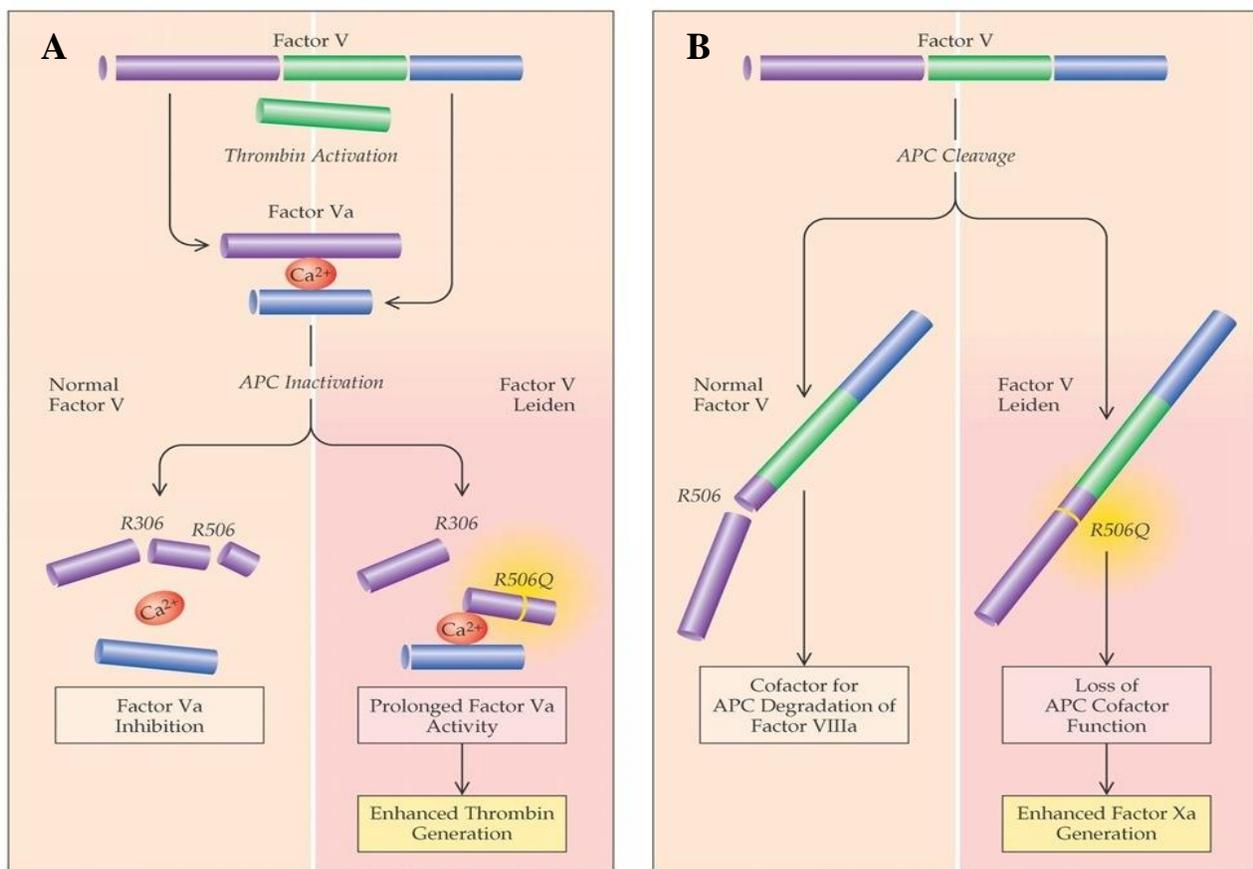
con la siguiente organización de dominios: A1-A2-B-A3-C1-C2 coincidente con la del factor VIII, pero a diferencia de este, determinadas secuencias en el dominio B son importantes para promover su activación por la trombina (Tirado, 2004).

El FV se activa principalmente por la trombina *in vivo*, aunque también puede hacerlo mediante el factor Xa, luego debido a la activación proteolítica de la trombina el dominio B se elimina, consiguiendo pasar a su forma activada (FVa), que está formada por una cadena pesada (A1-A2) y una cadena ligera (A3-C1-C2) las cuales permanecen unidas mediante enlaces no covalentes e iones  $Ca^{2+}$ , para ello la trombina fracciona el FV al nivel de la Arg709 y la Arg1545, produciendo una molécula heterodimérica de dos cadenas constituida por una cadena pesada A1-A2 asociada a una cadena ligera. Las dos cadenas están unidas de forma no covalente mediante iones metal ( $Ca^{2+}$ ). El FV en su forma activa (FVa) actúa como un cofactor del complejo protrombinasa (García, 2011).

Finalmente, el FVa es inactivado por la degradación proteolítica de su cadena pesada mediante la PCa, seguido de la disociación de los fragmentos A2, esto resulta más eficiente en presencia de fosfolípidos y  $Ca^{2+}$ . La inactivación mediante la PCa rompe la unión en la Arg506 y seguidamente en la Arg306 y Arg679, controlando así la velocidad y extensión de la coagulación (Venegas *et al.* 2006).

En circunstancias normales el corte en la posición Arg506 acelera el corte en las otras dos argininas, por lo que el aminoácido 506 que se codifica por el gen F5 dará lugar al triplete de la secuencia normal, CGA, que es la arginina (R). En caso de estar afectado con el FVL, se cambia el aminoácido que se codifica, por lo que el nuevo triplete CAA dará lugar a una glutamina (Q), esta alteración es designada como R506Q. En esta nueva situación la PCa no reconoce la posición 506, provocando la pérdida de ese sitio de corte, por lo que continúa buscando las siguientes dianas (Arg306 y Arg679). Por tanto, aunque la proteólisis en Arg306 y Arg679 consigue inactivar al FVa, esto no se logra hacer de forma eficiente (Lens *et al.* 2010).

La trascendencia fisiológica de esta alteración reside en que la velocidad de inactivación en estas condiciones es 10 veces más lenta que la observada en el FVa normal, lo que origina el fenómeno de la resistencia a la actividad anticoagulante de la PCa. También, el FVa actúa como un cofactor de PCa en la inhibición del factor VIIIa. Esta función del FVa como cofactor de la PCa requiere del corte del FV por la PCa en la Arg506; por lo que en el caso del FVL se considera que este tiene una función de cofactor deficiente, que no impide la producción del FXa, aumentando así la concentración de trombina, lo cual conduce a una mayor activación del Inhibidor de la Fibrinólisis Activable por la Trombina, creándose un estado de hipercoagulabilidad (ver Figura No. 4).



**Figura No. 4: Acción del factor V normal y del Factor V Leiden.** A. La degradación del FVL por la PCa es significativamente más lenta que la del FVa cuando la PCa no realiza la escisión en la arginina 506 lo cual prolonga la actividad del FVa y produce la generación de trombina aumentada. B. El FVa, también actúa como un cofactor de PCa en la inhibición del factor VIIIa. Esta función del FVa como cofactor de la PCa también requiere del corte del FV por la PCa en la arginina 506; por lo tanto, el FVL tiene una función de cofactor deficiente, que provoca el aumento de la producción del FXa. **Fuente:** Martínez (2016).

Cabe recalcar que existen otras alteraciones genéticas en el gen del factor V que pueden predisponer a la trombosis venosa, estas representan aproximadamente el 5% de los casos de resistencia a la PCa. Según Zafra (2011) incluyen las siguientes:

- FV Cambridge y FV Hong Kong: afectan la Arg306 en el sitio de escisión del FVa. En FV Cambridge se cambia una arginina por una treonina (G1091C). En FV Hong Kong se reemplaza una arginina por una glicina (A1090G).
- FV Liverpool: producida por la sustitución de una isoleucina por una treonina en el aminoácido 359. Fue identificado en dos hermanos que tenían severas manifestaciones trombóticas desde antes de los veinte años de edad.
- Mutación G2172C: encontrada en una familia china con tromboembolismo venoso asociado a resistencia a la PCa. Esta mutación parece interferir con el sitio de escisión de la Arg679 en la PCa.
- FV R2: se ha descrito un haplotipo denominado HR2 formado por 6 polimorfismos en el exón 13 del gen F5 y una variación en la secuencia del exón 16 que podrían estar implicados en una resistencia a la PCa y reducción de los niveles de FV.

### 7.3.1.1. Epidemiología

El polimorfismo G1691A constituye la más frecuente de las trombofilias hereditarias. Es responsable del 95% de los casos de resistencia a la PCa. Se ha podido demostrar que la coexistencia de trombosis venosa y el FVL se detecta en alrededor del 20-40% de los pacientes con antecedentes de trombosis, en tanto que la prevalencia en la población general es del 3-6% (Conte & Figueroa, 2015).

Por otro lado, un 78% de las mujeres embarazadas que presentan TVP son resistentes a la PCa y en un 46% el estudio del genotipo corresponde a un factor V anómalo (a pesar de ello, no se recomienda de forma rutinaria el cribado de trombofilia en las mujeres embarazadas, estando únicamente justificado en caso de historia personal o familiar de trombosis). El riesgo de padecer un evento trombótico entre aquellos con FVL es muy bajo antes de los 15 años y a partir de ese momento se incrementa de 2-4% por año. A los 50 años de edad, del 50 al 70% de los enfermos con trombofilia primaria han desarrollado algún tipo de trombosis. Aproximadamente, la mitad de ellos manifiesta trombosis espontánea, sin relación con otro factor de riesgo (Lens *et al.* 2010).

Existe un factor racial que debe considerarse, de hecho, esta alteración es más prevalente en la raza caucásica que en la hispana, nativa americana, afroamericana o asiática. En Suecia es del 15%, en Alemania del 10%, Holanda, Reino Unido y Estados Unidos presentaron una prevalencia de entre 3-5%, en España e Italia del 2%. En países sudamericanos se ha descrito una prevalencia similar a la hallada en la población caucásica occidental: Venezuela 1,6%, Argentina 5,1%, Costa Rica 2,0%, Brasil 2% y Chile 3,8%. No hallando diferencias significativas entre ambos sexos (López *et al.* 2007).

### 7.3.1.2. *Patología asociada al Factor V Leiden: Trombosis Venosa*

Las manifestaciones clínicas del TEV dependen de la localización y extensión del trombo. Las trombosis venosas que se producen en el sistema venoso profundo son más importantes que las del sistema venoso superficial, debido a la gravedad de sus manifestaciones potenciales (Boza, 2016).

La Trombosis Venosa Profunda (TVP) se define como una masa sólida que se forma en el interior del corazón o de los vasos sanguíneos, si esta masa se desprende tiende a producir una embolia. La mayoría de las TVP ocurren en las venas de los miembros inferiores y aunque puede ser asintomática, también puede ser responsable de inflamación en la pared vascular u obstrucción del flujo. Habitualmente, el trombo es lisado en otros de menor tamaño que se disuelven de forma espontánea en el torrente sanguíneo produciendo una recanalización y re-endotelización de la vena, con el restablecimiento del flujo en unos 10 días. Como los trombos venosos se forman en áreas de flujo muy lento, van a estar compuestos principalmente de fibrina, eritrocitos y relativamente pocas plaquetas (Villa & Veiras, 2009).

Según García (2011), la fisiopatología de la TVP se resume en la tríada de Virchow que define las circunstancias que aisladamente o en asociación permiten la formación del trombo:

- *Estasis venosa*: asociada a la permanencia prolongada de pie o sentado, siendo más frecuente en personas sedentarias, obesas, postrados con enfermedades graves, traumatismos o post-operatorios.
- *Lesiones endoteliales*: activan las vías intrínsecas y extrínsecas de la coagulación. Se favorece la adhesividad de las plaquetas, con liberación de sustancias capaces de estimular

la coagulación en contacto con el colágeno subendotelial. Esto altera el equilibrio entre factores procoagulantes y anticoagulantes, como sucede en traumatismos y marcapasos.

- *Hipercoagulabilidad*: donde el sistema de coagulación está alterado, favoreciendo los procesos trombóticos. Incluyen enfermedades neoplásicas, embarazo y diferentes terapias hormonales. En estos casos se produce un aumento del fibrinógeno y de algunos factores de la coagulación (VII, VIII, IX y X).

Los principales síntomas y signos son:

- Dolor.
- Edema blando y con fóvea al principio del proceso.
- Calor local.
- Cambios en el color de la piel, tales como cianosis y eritema.
- Circulación colateral que conduce a dilatación de venas superficiales.
- Cordón venoso palpable.
- Signo de Homans caracterizado por dolor en la parte alta de la pantorrilla al realizar la dorsiflexión del tobillo con la rodilla flexionada en un ángulo de 30°.

#### 7.3.1.2.1. Factores de riesgo

Martinez & Quintana (2015) describen los siguientes factores de riesgo:

- *Interacción gen-gen*: la interacción gen-gen propio de los individuos homocigotos incrementa el riesgo de trombosis (x80) frente a los heterocigotos (x8).
- *Combinaciones genéticas*: si cada trombofilia genética presenta un determinado riesgo de trombosis, es razonable que la asociación de varias de ellas incremente aún más el riesgo. Aunque los homocigotos presentan un elevado riesgo de desarrollar trombosis en edades tempranas este riesgo es mucho mayor si se asocia con homocigotos para la deficiencia de PC o PS. La asociación FVL y la deficiencia de PS hace que pocos portadores de ambas alteraciones queden libres de episodios trombóticos a lo largo de su vida. Por su parte, en individuos con heterocigosis para FVL y protrombina G20210A de forma simultánea, el riesgo trombótico es veinte veces mayor que en individuos en los que la heterocigosis es solo para FVL o protrombina.

Rodrigo, Villa & Veiras (2010) mencionan que debido a que no todos los pacientes portadores del FVL presentan complicaciones tromboembólicas, se sugiere que pueden existir factores de riesgo genéticos adicionales en los portadores sintomáticos.

- *Interacción gen-factor ambiental:* son ejemplos típicos la asociación trombofilia y embarazo/puerperio. La presencia de FVL se ha asociado con un riesgo entre 5 y 52 veces superior de padecer un episodio trombótico durante el embarazo y el puerperio si se compara con mujeres no embarazadas con trombofilia (Conte & Figueroa, 2015).

#### 7.3.1.2.2. *Complicaciones de la trombosis venosa*

##### 7.3.1.2.2.1. Síndrome Post Trombótico (SPT)

Es una secuela crónica tardía de la enfermedad tromboembólica, la cual forma parte de la historia natural de la misma, siendo la complicación más común de TVP. La morbi-mortalidad es baja, aunque su desarrollo depende de las características y antecedentes de cada paciente. Se estima que esta entidad afecta entre el 17 a 50% de los pacientes que han padecido una TVP de los miembros inferiores (Botella, Labiós, Portolés & Cabanes, 2013).

En estos, lo que sucede es que con el paso del tiempo la vena afectada suele recanalizar mediante un proceso de fibrinólisis, así la pared venosa y las cúspides de las válvulas pueden sufrir daño permanente y perder la capacidad para cerrar de forma adecuada lo cual origina reflujo venoso e incompetencia valvular debido a que trombos de gran tamaño ocasionan una destrucción permanente de las válvulas venosas, esto puede establecerse alrededor de un año después del episodio trombótico agudo, lo cual genera la aparición de hipertensión venosa que conduce a los signos y síntomas del SPT con características inflamatorias crónicas tales como edema, dolor y pesadez de la extremidad afectada. En casos severos pueden desarrollarse úlceras venosas (Botella *et al.* 2013).

Los eventos trombóticos que ocurren después de una TVP inicial pueden ser de tres tipos: extensión del trombo a una zona de la extremidad inicialmente no afectada, propagación del trombo a nuevos segmentos en la extremidad ipsilateral y retrombosis de un segmento parcialmente ocluido o recanalizado.

Según Greatty (2010), las alteraciones en el miembro con SPT pueden ocurrir inclusive hasta 2 años después de una trombosis aguda y se deben a:

- El proceso inflamatorio desencadenado por la hipertensión venosa lleva a daños a nivel de los tejidos circundantes al vaso sanguíneo con aumento de la permeabilidad, infiltración de células inflamatorias -como monocitos, mastocitos, macrófagos, neutrófilos- y la activación de las células endoteliales junto a liberación de radicales libres. También, existe un aumento de la presión hidrostática en el vaso produciendo la extravasación del plasma con edema del miembro.
- La hemoglobina de los hematíes extravasados es degradada depositándose en el tejido celular subcutáneo lo cual conduce a hiperpigmentación pardusca de la piel del miembro comprometido por presencia de hemosiderina.
- Se produce un estado de hipofibrinólisis a nivel cutáneo que lleva a cambios en las características de la piel y endurecimiento que muchas veces acompaña a una limitación en el rango de movilización del miembro afectado.

#### 7.3.1.2.2.2. Trombosis Venosa Profunda Recurrente (TVPR)

Los eventos trombóticos que ocurren pueden ser el de la extensión del trombo a una nueva zona de la extremidad que no se encontraba afectada. La TVPR que ocurre en la misma extremidad se asocia a un riesgo seis veces mayor de desarrollo de SPT, probablemente debido al mayor daño de las válvulas venosas u obstrucción al flujo venoso. Existen diferentes factores asociados al riesgo aumentado de TVPR tales como la deficiencia hereditaria de inhibidores del sistema de coagulación, donde el más frecuente es la deficiencia del FVL. A pesar de emplear una anticoagulación inicial efectiva, la TVPR puede aparecer entre los 2 y 8 años luego de la trombosis inicial (Botella, 2003).

#### 7.3.1.2.2.3. Embolia Pulmonar (EP)

Se desencadena a partir de un trombo originado en las venas profundas de las extremidades inferiores, usualmente trombos extendidos o producidos en las venas poplíteas o anteriores (Tirado, 2004).

De un trombo venoso pueden desprenderse fragmentos, que viajan por el sistema venoso hasta encontrar el sistema vascular pulmonar, que actuando como un filtro, los atrapa y produce el cuadro clínico de infarto del parénquima pulmonar donde hay áreas ventiladas pero no perfundidas con bronco-constricción e hipoxemia cuya gravedad depende de su extensión. Los trombos

localizados a nivel poplíteo o en áreas más proximales presentan mayor riesgo de producir EP, de hecho, un 50% de las TVP proximales embolizan, frente a un 30% de las distales (Uresandi, Iruin, Gómez & Uresandi, 2008).

El EP tiene una alta morbilidad como causa de muerte en pacientes hospitalizados con TVP, en los casos graves la presencia de colapso circulatorio y paro cardíaco puede provocar muerte súbita. La muerte ocurre en hasta el 15 % de los pacientes. Sin embargo, es posible que la EP no se pueda diagnosticar debido a sus síntomas clínicos inespecíficos. Los signos y síntomas más comunes incluyen: disnea, taquipnea, dolor torácico, dificultad para respirar, tos, hemoptisis, taquicardia, ansiedad, síncope, estertores respiratorios (crepitantes) y sudoración (Botella, 2003).

La gravedad clínica de la EP varía dependiendo de la reserva cardiopulmonar inicial del paciente, el grado en que el émbolo ocluya la circulación pulmonar, ubicación, tamaño y número de los émbolos. Una EP masiva puede ocasionar un choque cardiogénico, mientras que los émbolos pequeños pueden ser asintomáticos (Tirado, 2004).

Krämer & Valdés (2015) explican que las consecuencias fisiopatológicas de la EP incluyen los efectos sobre el parénquima pulmonar, el intercambio gaseoso y sobre la función del lado derecho del corazón que puede conducir a una insuficiencia cardíaca derecha y un colapso circulatorio periférico o shock, esto si el débito cardíaco se compromete de forma importante.

#### 7.3.1.2.2.4. Complicaciones gestacionales

Las trombofilias se asocian con mayor riesgo de complicaciones gestacionales agrupadas en complicaciones tempranas como la Pérdida Gestacional Recurrente (PGR) y complicaciones tardías que incluyen muerte intrauterina, desprendimiento placentario, restricción del crecimiento intrauterino, nacimiento de mortinatos y preeclampsia. En el mecanismo que lleva a las complicaciones están implicadas la hipercoagulabilidad y la inflamación, afectando el normal desarrollo embrionario y fetal por mala irrigación e hipoflujo. La pérdida gestacional afecta del 12-15% de las parejas en edad reproductiva y es recurrente en el 1-2% de ellas. Las trombofilias heredadas son causas aceptadas de PGR (Castañeda, Cardona & Cadavid, 2012).

La Organización Mundial de la Salud ha definido la PGR como la presencia de tres o más abortos consecutivos antes de las 20 semanas de gestación cada una con un feto menor de 500 gramos de peso. Las parejas con aborto recurrente pueden dividirse en subgrupos de acuerdo con su historia

reproductiva: primario (sin embarazos a término con producto vivo de la concepción), secundario (serie de pérdidas consecutivas luego de un nacido vivo) y terciario (tres abortos, pero no consecutivos). El aborto recurrente primario ha sido asociado más frecuentemente con trombofilias (Mateo, Hernández, Rivera, 2016).

Las trombofilias hereditarias están fuertemente asociadas con pérdidas fetales en el segundo trimestre, con evidencia menos convincente para el primer trimestre. Estudios revelan asociaciones entre el aborto recurrente de fetos de menos de 13 semanas y la presencia de trombofilias relacionadas con el FVL, resistencia a la PCa, mutaciones en el gen de la protrombina y deficiencia de PS (Flores, Jacobo, Segura & Stern, 2014).

El mecanismo propuesto ha sido trombosis de la vasculatura útero-placentaria en las arterias espiraladas y el espacio intervelloso por respuesta hemostática aumentada que afecta la perfusión placentaria y lleva a alteraciones en el crecimiento y desarrollo fetal (Castañeda *et al.* 2012).

### 7.3.1.3. *Terapia farmacológica*

La anticoagulación es la base del tratamiento para la condición clínica asociada al FVL, pues reduce la incidencia de EP, SPT y la recurrencia de la TVP. La terapia se divide clásicamente en 3 fases: la fase aguda, durante los primeros 5-10 días después del diagnóstico, la fase de mantenimiento de 3-6 meses y la fase extendida más allá de la fase de mantenimiento. El tratamiento anticoagulante puede incluir el uso de Heparinas de Bajo Peso Molecular (HBPM), Heparina No Fraccionada (HNF) y antagonistas de la vitamina K (warfarina). Otras medidas terapéuticas en este tipo de condiciones clínicas incluyen las medias de compresión fuerte, filtros de vena cava inferior y la tromboembolectomía (Papponetti, 2016).

El tratamiento anticoagulante ha de iniciarse con HBPM hasta que el diagnóstico de TVP sea excluido por pruebas de imagen. La terapia anticoagulante de mantenimiento ha de realizarse con anticoagulantes orales (acenocumarol o warfarina), su administración ha de comenzar en el primer día del tratamiento, tras la dosis de carga de HBPM o HNF. Dado que los anticoagulantes orales (ACO) tardan al menos 72 horas en actuar, se debe mantener durante unos días el solapamiento entre HNF/HBPM y los ACO. Se retira la heparina cuando el INR (Razón Normalizada Internacional) es mayor de 2 durante 2 días consecutivos. El INR diana del tratamiento con ACO es 2.5 (entre 2 y 3) para un primer episodio de TVP (Altuna *et al* 2012).

La duración del tratamiento ante crisis trombóticas ha de ser de entre 3 y 6 meses en pacientes con factores de riesgo reversibles y de al menos 12 meses en pacientes con TVP recurrente. El mantenimiento de la terapia farmacológica en periodos más prolongados debe realizarse valorando riesgo/beneficio. En caso de que los ACO estuvieran contraindicados (embarazo, alergia, etc.) o fuesen inefectivos, la terapia de mantenimiento se realizará con heparina subcutánea (HNF o HBPM). El tratamiento con anticoagulantes en los pacientes con FVL no está indicado en los individuos heterocigotos, a menos que presenten crisis de trombosis venosa, los homocigotos sí deben ser anticoagulados de forma permanente (Carmona *et al.* 2003).

#### 7.3.1.4. *Detección del Factor V Leiden utilizando la técnica molecular PCR-RFLP*

Inicialmente es necesario mencionar que los estudios de escrutinio de la trombosis venosa incluyen la realización de: dímero D, ecografía doppler, angiografía por tomografía computarizada y flebografía. Por su parte, los estudios para valorar la resistencia a la PCa son: tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada y las pruebas de evaluación de la función y/o cantidad de PC y PS (MacCallum, Bowles & Keeling 2014).

Debido a la asociación de resistencia a la PCa con otros factores genéticos, resulta necesario que, ante sospecha de trombofilia de causa heredada, se soliciten además del estudio de FVL, exámenes que permitan la detección de alteraciones genéticas en los genes que codifican para la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), factor II G20210A, homocisteína y otras que se estimen convenientes. Entre las técnicas moleculares usadas para la detección de estas, además de PCR-RFLP, se encuentran las siguientes: secuenciación de ADN, *Invader Assay*, Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), identificación por Fluorescencia de fragmentos de ADN por PCR tiempo real (Zabalegui, 2000). El uso de PCR-RFLP requiere de una previa extracción de ADN, seguido de amplificación del material genético, digestión con enzima de restricción y visualización del producto en gel de electroforesis.

##### 7.3.1.4.1. *Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*

Según Sánchez *et al.* (2013), se basa en la replicación exponencial *in vitro* del ADN mediante ciclos repetitivos. Para ello se necesita una cadena de ADN molde, ADN polimerasa (ADNpol), cofactores para la actividad de la ADNpol, desoxirribonucleótidos (dNTPs) y oligonucleótidos (primers). El proceso da inicio con una desnaturalización a 95 °C para separación de la doble

cadena de ADN a lo que le siguen ciclos de amplificación que constan de las siguientes temperaturas:

- 94-98°C: desnaturalización, tiene como objetivo separar la doble cadena de ADN a cadenas simples y destruir las estructuras secundarias del ADN, lo que permite el acceso de los oligonucleótidos a la cadena molde en sus secuencias complementarias, en el siguiente cambio de temperatura.
- 55-60°C: alineación, a esta temperatura la mayoría de los oligonucleótidos hibridan, para ello se genera la energía cinética necesaria para que los oligonucleótidos busquen su secuencia complementaria y formen puentes de hidrógeno con la cadena molde, dejando disponible el extremo 3'OH de la cadena.
- 68-72°C: extensión, dada a la temperatura óptima para el funcionamiento de la ADNpol empleada, así es posible la adición de nucleótidos consecutivos por acción de la ADNpol. En el caso de la Taq Polimerasa la temperatura más usada es la de 72°C.

Este ciclaje de temperatura se repite continuamente entre 25-40 ocasiones, teóricamente en cada ciclo de amplificación se duplica la cantidad de producto inicial hasta que los reactivos se agotan. Una vez terminados los ciclos designados, la temperatura de extensión se mantiene por unos minutos (amplificación final), permitiendo que la ADNpol termine la extensión de los productos a los cuales se encontraba unida.

#### *7.3.1.4.2. Digestión con enzimas de restricción*

Las enzimas de restricción son proteínas aisladas de bacterias que cortan en fragmentos la molécula lineal de ADN, esto basados en su capacidad de distinguir ADN exógeno de su propio ADN gracias a que este último se encuentra metilado y, por tanto, protegido de la digestión. Para realizar dichos cortes reconocen secuencias específicas de nucleótidos, generalmente palindrómicas y digieren dejando extremos romos o cohesivos. La actividad de estas depende de condiciones precisas que incluyen pH, iones, temperatura, concentración de sales, grado de metilación del ADN y pureza biológica del ADN (Cardé, 2013).

La técnica PCR-RFLP se fundamenta en que los SNP pueden abolir o crear sitios de restricción para una enzima determinada, luego de que el fragmento a digerir haya sido amplificado mediante

PCR punto final, permitiendo discriminar el genotipo por visualización de los fragmentos de diferentes tamaños al separarlos por electroforesis.

#### 7.3.1.4.3. *Electroforesis*

La detección del producto de amplificación se realiza en una electroforesis en gel de agarosa o acrilamida, en donde las moléculas migran en un campo eléctrico a través de una masa porosa según su peso molecular y carga eléctrica. Los ácidos nucleicos poseen carga negativa debido a su esqueleto de fosfatos, así en una electroforesis, el ADN migra hacia el ánodo. El producto se visualiza agregando colorantes fluorescentes, tales como el bromuro de etidio el cual, si se expone a la luz UV, permite la observación de banda(s) en donde la intensidad del color se considera proporcional a la cantidad de producto amplificado y su longitud se verifica interpolando contra un marcador de peso molecular de longitud conocida (Sánchez *et al.* 2013).

Los fragmentos digeridos con enzimas de restricción deben ser del tamaño suficiente para permitir una interpretación clara en el gel. De este modo, se determina la presencia o ausencia de defectos genéticos causantes de trombofilias distinguiendo entre los genotipos homocigoto y heterocigoto.

#### 7.3.1.4.4. *Estandarización de la prueba molecular*

El término estandarización deriva del término *standard*, referido a un método establecido y aceptado para realizar determinada actividad. Tiene como connotación principal seguir un proceso a través del cual se tiene que proceder para alcanzar un fin previamente establecido. Supone cumplir con reglas que, si bien en ciertos casos pueden estar implícitas, en la mayoría de las circunstancias corresponden a reglas explícitas y de importante cumplimiento a fin de obtener los resultados esperados para la actividad en cuestión (Ruisánchez, Trullols & Ruíz, 2012). Según Mattocks *et al.* (2010), los parámetros de calidad para estandarización de pruebas diagnósticas cualitativas son:

- *Especificidad*: probabilidad de que la técnica proporcione un resultado negativo cuando en la muestra estudiada no existe el sustrato de interés diagnóstico, dicho de otro modo, es la proporción de muestras negativas que son correctamente identificadas.
- *Sensibilidad*: probabilidad de que la técnica proporcione un resultado positivo cuando en la muestra estudiada está presente el sustrato de interés diagnóstico, por ello, son la proporción de muestras positivas correctamente identificadas.

- *Falso positivo*: probabilidad de que la muestra conocida como negativa, de positiva por el método en estandarización.
- *Falso negativo*: probabilidad de que la muestra conocida como positiva, de negativa por el método en estandarización.
- *Exactitud diagnóstica*: proporción de resultados correctos (verdaderos positivos más verdaderos negativos), también puede definirse como la capacidad para detectar correctamente los positivos y los negativos. Por tanto, resulta del grado de concordancia entre el resultado obtenido en un ensayo por el método en estandarización y el valor obtenido previamente para esta misma muestra por un método o centro de referencia en la materia en estudio.
- *Límite de detección*: concentración más baja del ADN diana que puede ser detectada bajo las condiciones de operación establecidas y que es capaz de generar una respuesta analítica positiva con el método analítico. Los resultados se expresan como detectado/no detectado.
- *Repetibilidad*: grado de concordancia entre resultados de sucesivas mediciones del mismo mensurando realizadas en las mismas condiciones. Dicho concepto corresponde a la precisión en las condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen en la misma corrida, con el mismo método, operador y durante un corto intervalo de tiempo.
- *Reproducibilidad*: grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando realizadas en diferentes condiciones. En este caso, los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, sobre el mismo mensurando, pero con diferentes operadores, corridas, días, etc. Al igual que la repetibilidad corresponde a un parámetro para evaluación de la precisión del ensayo.

## 8. DISEÑO METODOLÓGICO

### 8.1. Tipo de estudio

- Según el tipo de diseño es Cuasi-experimental.
- Según el alcance de la investigación es Exploratorio.
- Según su prolongación en el tiempo es Transversal.

### 8.2. Área de estudio

- Sección de anticoagulados del Hospital Escuela “Roberto Calderón”.

### 8.3. Unidad de análisis

- Pacientes con diagnóstico de trombosis venosa.

### 8.4. Población

- La población estuvo conformada por 74 pacientes con diagnóstico de trombosis venosa que fueron atendidos en el Hospital Escuela “Roberto Calderón” durante el periodo en estudio.

### 8.5. Muestra

- La muestra estuvo conformada por 21 pacientes diagnosticados con Trombosis Venosa Profunda de origen idiopática, esto correspondió al 28,4% de la población en estudio.

### 8.6. Tipo de muestreo

- No probabilístico, por conveniencia.

### 8.7. Criterios de inclusión

- Paciente atendido en la sección de anticoagulados del Hospital Escuela “Roberto Calderón”.
- Paciente atendido durante julio-septiembre de 2017.
- Paciente con historial de TVP de origen idiopática.
- Paciente cuya edad del primer evento trombótico fue inferior o igual a los 60 años.
- Paciente con antecedentes familiares de trombosis venosa, el historial familiar se consideró positivo si al menos un familiar de hasta segundo grado había sufrido un evento trombótico.

- Que el paciente aceptara participar en el estudio mediante consentimiento informado.

### **8.8. Criterios de exclusión**

- Paciente que no haya sido atendido en la sección de anticoagulados del Hospital Escuela “Roberto Calderón”.
- Paciente que no haya sido atendido entre julio-septiembre de 2017.
- Paciente sin historial de TVP de origen idiopática.
- Paciente cuya edad del primer evento trombótico fuese mayor a 60 años.
- Paciente sin antecedentes familiares de TVP.
- Paciente que no aceptara participar en el estudio mediante consentimiento informado.

### **8.9. Recolección de la información**

La información teórica fue recolectada por medio de revisión de fuentes bibliográficas secundarias y análisis de contenido. Se investigó en bases de datos y revistas en línea tales como SIBDI-UCR, E-libro, New England Journal of Medicine (NEJM), blood, Asociación Internacional de Trombosis y Hemostasia, Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia y Biblioteca Virtual en Salud (BVS). En estas se realizó la búsqueda de documentos utilizando las siguientes palabras claves o sus equivalentes en inglés: Factor V Leiden, polimorfismo G1691A, PCR-RFLP, trombofilias hereditarias, trombosis venosa, trombosis venosa profunda y estados de hipercoagulabilidad. De este modo, se seleccionaron artículos que pudiesen ser de interés, eligiendo textos completos en idioma español o inglés publicados preferiblemente entre el año 2010 y 2017 ambos inclusive. La información concerniente a los pacientes fue obtenida mediante una hoja de recolección de datos en la cual se registró información como edad, sexo, signos, síntomas y demás datos que se estimaron convenientes para la oportuna selección de los participantes del estudio.

### **8.10. Instrumentos de recolección de la información**

Se utilizó hoja de recolección de datos del paciente (ver Anexo No. 8), cuaderno de registro de concentraciones de ADN (ver Anexo No. 5), bitácora de trabajo de procedimientos a realizar: protocolo de PCR, digestión con enzima de restricción y corrida electroforética (ver Anexo No. 6).

### **8.11. Obtención de muestras y controles**

Se requirió por paciente al menos 4 mL de sangre periférica obtenida por punción venosa y recolectada en tubos con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Las muestras se transportaron (en termo y con refrigerante) a 4°C hasta su almacenamiento (también a 4°C) en el Laboratorio de Biología Molecular MA. “Elmer Cisneros” *in memoriam*, lugar en el cual dichas muestras se procesaron.

Como controles no mutados se utilizaron muestras de personas sin historial de haber manifestado signos o síntomas de trombosis venosa y que habían resultado negativos al polimorfismo G1691A y como controles positivos se usaron muestras de ADN con el polimorfismo G1691A (genotipo heterocigoto), los cuales se suministraron por el laboratorio molecular del Hospital Nacional del Niño "Dr. Carlos Sáenz Herrera", San José, Costa Rica, lugar donde fueron diagnosticados mediante PCR-RFLP.

### **8.12. Procesamiento de la información**

Para la edición y presentación del trabajo se usó Microsoft Office 2016.

### **8.13. Documento de referencia**

Se utilizó como referencia para la estandarización de la técnica, la publicación *Analytical Evaluation of Primer Engineered Multiplex Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism for Detection of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A* descrita por Huber, McMaster y Voelkerding (2000).

### **8.14. Consideraciones éticas de la investigación**

Para la ejecución de esta investigación se realizó de forma escrita un consentimiento informado (ver Anexos No. 8), en su momento se les explicó a los pacientes las generalidades del estudio, recolección y procesamiento de la muestra, así como la importancia de ser partícipes, además se les mencionó que los resultados únicamente serían utilizados con fines académicos. La información obtenida fue resguardada de forma confidencial. Una vez obtenidos los resultados, estos se entregaron al médico de la sección de anticoagulados del Hospital Escuela “Roberto Calderón” designado para que los resultados fuesen informados a los pacientes en estudio. Cabe recalcar, que en esta investigación no existen conflictos de interés para ninguna de las partes.

## **8.15. Protocolo estandarizado para la detección del FVL.**

### **8.15.1. Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realiza a partir de 200  $\mu$ L de sangre total con EDTA, mediante la utilización del QIAamp DNA Mini Kit, siguiendo el protocolo ya estandarizado por el Laboratorio de Biología Molecular MA. “Elmer Cisneros” *in memoriam*.

Antes de empezar, realizar las siguientes actividades:

- Equilibrar las muestras a temperatura ambiente (15-25°C).
- Equilibrar buffer AE a 37°C para la elución en el paso *p*).

El procedimiento para la extracción de ADN es el descrito a continuación:

- a) En un tubo eppendorf previamente rotulado añadir 20  $\mu$ l de proteinasa K, 200  $\mu$ l de sangre total y 200  $\mu$ l del buffer AL.
- b) Mezclar en vórtex durante 15 segundos.
- c) Incubar a 56°C por 10 minutos.
- d) Centrifugar brevemente hasta alcanzar 8,000 RPM.
- e) Agregar 200  $\mu$ l etanol y mezclar durante 15 segundos en vórtex.
- f) Centrifugar brevemente hasta alcanzar 8,000 RPM.
- g) Trasvasar el contenido del tubo eppendorf a una columna de purificación, sin mojar el borde. Cerrar con tapa.
- h) Centrifugar a 8,000 RPM por 1 minuto.
- i) Abrir cuidadosamente la columna de purificación y añadir 500  $\mu$ l de buffer AW1 sin mojar el borde. Cerrar la tapa.
- j) Centrifugar a 8000 RPM durante 1 minuto.
- k) Colocar la columna en un tubo colector y desechar el tubo que contiene el filtrado.
- l) Abrir cuidadosamente la columna de purificación y añadir 500  $\mu$ l de buffer AW2 sin mojar el borde. Cerrar la tapa.
- m) Centrifugar a 13,500 RPM durante 3 minutos.
- n) Descartar el filtrado y centrifugar a 13,500 RPM por 1 minuto.
- o) Descartar el tubo colector. Trasvasar el contenido a un tubo eppendorf de 1.5 ml, previamente rotulado.

- p) Añadir 30 µl de buffer AE y dejar reposar por 5 minutos.
- q) Centrifugar a 8.000 RPM durante 1 minuto.
- r) Cuantificar el ADN extraído en nanodrops, la concentración de ADN deberá encontrarse entre 50-300 ng/µl.
- s) Determinar la relación 260/280, la cual deberá estar entre 1.8 – 2.0 DO.
- t) Guardar el ADN a -20°C hasta su procesamiento.

#### **8.15.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Para la amplificación del polimorfismo (ver en Anexos No.1 la localización del polimorfismo en el gen F5) utilizar primers y metodología descritos por Huber *et al.* (2000).

En cada corrida se deberán montar los controles correspondientes:

- Para procesar un control negativo, reemplazar el ADN por agua grado reactivo.
- Para procesar un control no mutado, utilizar ADN de paciente previamente detectado como no portador del polimorfismo G1691A.
- Para procesar un control positivo, utilizar ADN de paciente previamente detectado con el polimorfismo G1691A.

##### **8.15.2.1. Reconstitución de primers**

- a) Centrifugar tubos con primers liofilizados tanto forward como reverse (ver en Anexos No. 2 las especificaciones de los primers para amplificación del gen F5).
- b) Para llevarlos a una concentración de 100x, agregar a cada tubo 250 µl de agua grado PCR.
- c) Dejar reposar por 5 minutos.
- d) Para preparar 50 µl de volumen a una concentración de 10x, usar 5 µl de primers 100x y 45 µl de agua grado PCR.
- e) Hacer alícuotas tanto para primers forward como reverse.

##### **8.15.2.2. Mix para PCR**

- a) Calcular la cantidad de componentes para la PCR usando los volúmenes y reactivos especificados en el Cuadro No. 1.

**CUADRO NO. 1: MIX PARA PCR**

COMPONENTE	VOLUMEN POR MUESTRA (µl)
Buffer Y 10x (2mM de MgCl <sub>2</sub> )	5
Enhancer 5x	10
dNTPs	1
Primers 10x (forward)	1.5
Primers 10x (reverse)	1.5
Taq Polimerasa (2.5 UI)	0.5
ADN	Equivalente a 300 ng/µl
Agua grado reactivo	A completar volumen final
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<b>50</b>

b) Programar el termociclador según se indica en el Cuadro No. 2.

**CUADRO NO. 2: PERFIL DE TEMPERATURA PARA AMPLIFICAR EL GEN F5 MEDIANTE PCR.**

<b>Desnaturalización</b>	Temperatura (°C)	95
	Tiempo (minutos)	10
<b>Amplificación</b>	Número de ciclos	40
	94 °C durante 1 minuto	
	55 °C durante 1 minuto	
	72 °C durante 1 minuto	
<b>Extensión final</b>	Temperatura (°C)	72
	Tiempo (minutos)	05
<b>Enfriamiento</b>	Temperatura (°C)	04
	Tiempo	Indefinido

### 8.15.3. Digestión con enzima de restricción

Usar la enzima de restricción *Hind III* (ver en Anexo No. 3 las especificaciones de *Hind III*).

a) Calcular la cantidad de componentes para la digestión con enzimas de restricción usando la información suministrada por el Cuadro No. 3.

**CUADRO NO. 3: MIX PARA DIGESTIÓN CON *HIND III***

COMPONENTE	VOLUMEN POR MUESTRA (µl)
Producto de PCR (ADN amplificado)	25
Buffer 10x	4.5
Enzima <i>Hind III</i>	0.5
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<b>30</b>

- b) Incubar a 37°C ya sea por 3 horas o durante toda la noche.
- c) Inactivar la enzima a 80 °C por 20 minutos.

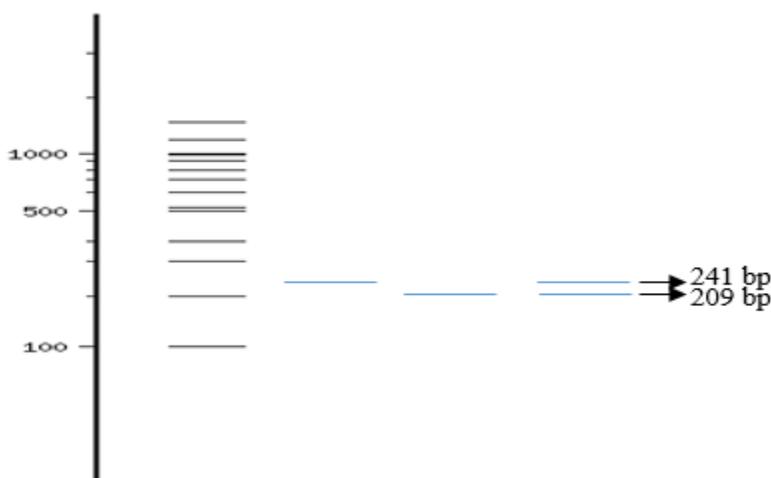
#### **8.15.4. Electroforesis en gel de agarosa**

- a) Limpiar y acomodar la cámara de electroforesis y el peine a usar.
- b) Para preparar un gel de agarosa al 3.0%, pesar 4.5 gramos de agarosa en la balanza analítica, hacerlo en un beaker.
- c) Agregar 150 mL de buffer TBE 1x (Tris base, ácido bórico y EDTA con pH de 7.2) medirlo en una probeta.
- d) Añadir una pequeña cantidad de TBE 1x (alrededor de 30 mL). Y luego, la cantidad restante de TBE 1x.
- e) Disolver la agarosa calentando la mezcla en microondas durante 2 minutos y 30 segundos.
- f) Dejar enfriar la agarosa hasta que no se observe emisión de vapor.
- g) Agregar 4 µl de bromuro de etidio, mezclar vigorosamente.
- h) Verter la agarosa en la plataforma de electroforesis y dejar solidificar por 25 minutos.
- i) Remover cuidadosamente el peine.
- j) Agregar en la cámara, TBE 1x hasta cubrir el gel (~1 mm por encima del gel).
- k) Atemperar productos de amplificación digeridos con la enzima de restricción y el marcador de peso molecular (100 bp).
- l) En un trozo de parafilm mezclar las muestras de ADN, controles y marcadores de peso molecular, hacer esto de la siguiente manera:
  - En el pozo 1 colocar 3 µl de marcador de peso molecular (100 bp) con 1 µl de loading buffer 6x.
  - En pozo 2 colocar 8 µl de producto digerido y 2.0 µl de loading buffer 6x.
  - En el siguiente pozo después de haber montado todas las muestras de ADN colocar 8 µl de control no mutado y 2.0 µl de loading buffer 6x.
  - En el siguiente pozo después de haber montado el control no mutado, colocar 8 µl de control positivo y 2.0 µl de loading buffer 6x.
  - En el pozo que sigue colocar 8 µl de control negativo y 2.0 µl de loading buffer 6x.
- m) Colocar cables correspondientes a la cámara para que suministren el voltaje necesario.
- n) Cerrar la cámara de electroforesis y programar el equipo a 120 V por 1 hora y 40 minutos.

- o) Examinar el gel en luz UV, colocándolo sobre el transiluminador para visualizar las bandas correspondientes al fragmento digerido, que se verifica por el tamaño que presenta según interpretación del Cuadro No. 4 (ver Figura No. 5).

**CUADRO NO. 4: INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS**

<b>TAMAÑO DEL FRAGMENTO OBTENIDO</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
Un fragmento de 241 bp.	Individuo sin el polimorfismo G1691A.
Un fragmento de 241 bp, 209 bp (la banda restante de 32 bp producido por <i>Hind III</i> en individuos con FVL no se logra observar en el gel de electroforesis al 3%).	Individuo heterocigoto para el polimorfismo G1691A.
Un fragmento de 209 bp (la banda restante de 32 bp producido por <i>Hind III</i> en individuos con FVL no es observable en gel de electroforesis al 3%).	Individuo homocigoto para el polimorfismo G1691A.



**Figura No. 5: Esquema representativo de la migración de las bandas de ADN mediante electroforesis utilizando la enzima de restricción *Hind III*.** 1) Marcador de peso molecular de 100 bp. 2) Individuo sin el polimorfismo G1691A. 3) Individuo homocigoto para el polimorfismo G1691A. 4) Individuo heterocigoto para el polimorfismo G1691A.

#### **8.15.5. Evaluación de parámetros de desempeño de la técnica PCR-RFLP**

Se verificó la probabilidad de clasificar a un individuo sin el polimorfismo (especificidad) o a un individuo portador del polimorfismo (sensibilidad), esto fue posible procesando con la técnica en

estandarización a controles positivos y no mutados previamente analizados por un laboratorio de referencia y cuyo resultado ya era conocido. Con una tabla de contingencia se hicieron los siguientes cálculos:

***Sensibilidad:***

$$\frac{\text{Verdaderos positivos}}{(\text{Verdaderos positivos} + \text{falsos negativos})} \times 100$$

***Especificidad:***

$$\frac{\text{Verdaderos negativos}}{(\text{Verdaderos negativos} + \text{falsos positivos})} \times 100$$

***Exactitud diagnóstica:***

$$\frac{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Verdaderos Negativos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos Positivos} + \text{Falsos Negativos}} \times 100$$

***Límite de detección:***

Para determinar el umbral de detección inferior de la prueba, se realizaron diluciones dobles seriadas a partir de un control positivo con 300 ng/μl de concentración de ADN.

***Repetibilidad del ensayo:***

Este parámetro se evaluó procesando 5 veces un control positivo y un control no mutado. Dicho análisis se llevó a cabo por un mismo operario, en una misma corrida y día.

***Reproducibilidad del ensayo:***

Este parámetro se evaluó procesando un control positivo y un control no mutado, por tres diferentes operarios, en distintas corridas y días.

***8.15.6. Detección de Factor V Leiden en pacientes con trombosis venosa***

Una vez estandarizada la técnica y evaluado el desempeño del ensayo se procesaron muestras de pacientes con diagnóstico de trombosis venosa mediante el protocolo establecido.

## 9. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	SUBVARIABLE	CRITERIO	INDICADOR	VALOR
Extracción de ADN.	Concentración de ADN extraído.	Concentración óptima debe ser superior a 50 ng/μl.	< 50 ng/μl 50-300 ng/μl > 300 ng/μl	-Sí -No
	Valoración de la pureza del ADN extraído: Índice 260/280.	Relación óptima cuando se encuentra entre 1.8 y 2.0 DO.	< 1.8 ng/μl 1.8-2.0 ng/μl > 2.0 ng/μl	-Sí -No
PCR punto final.		Se logra la amplificación del ADN diana.	Se visualiza banda de ADN en el gel de electroforesis.	-Sí -No
Digestión con enzima de restricción.		Se logra la digestión del ADN amplificado, distinguiendo tamaños, según genotipo.	Se visualiza en el gel de electroforesis las siguientes bandas: -Banda de 241 bp (Individuo sin polimorfismo). -Banda de 209 bp (Homocigoto). -Bandas de 209 bp y 241 bp (Heterocigoto).	-Sí -No
Electroforesis en gel de agarosa.	Concentración del gel de agarosa.	En función de la concentración de agarosa es posible separar fragmentos de ADN según su tamaño.	-3% -2%	-Sí -No
	Visualización de las bandas de ADN.	La observación de las bandas depende del agente de tinción empleado.	-Bromuro de etidio -SYBR Green -Gel Red	-Sí -No
	Voltaje.	El voltaje se aplica según el peso molecular del ADN a separar. Para productos de PCR entre 100 bp y 1.5 kb se recomienda el uso de voltajes entre 75 y 120 V.	< 75 V 75-120 V > 120 V	-Sí -No
	Tiempo de corrida.	Según el tamaño del gel se deberá hacer elección del tiempo de corrida idóneo.	-60 minutos. -80 minutos. -100 minutos.	-Sí -No

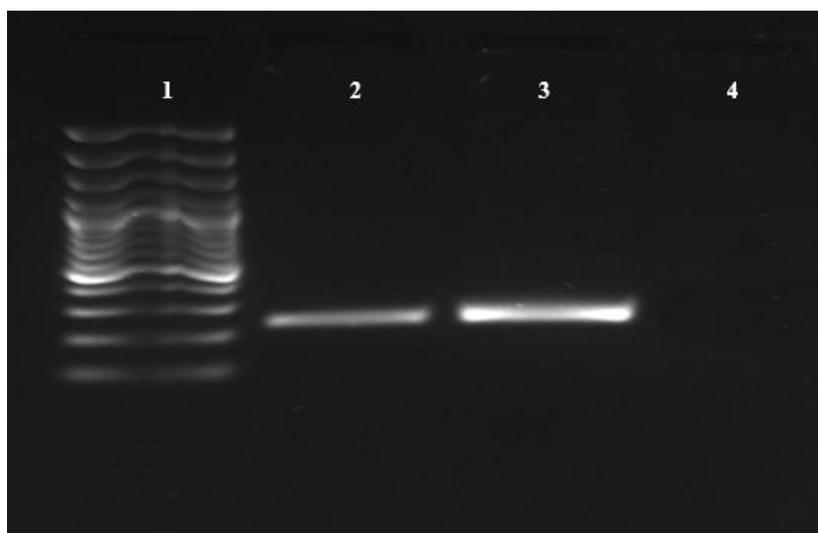
**| OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

<b>VARIABLE</b>	<b>SUBVARIABLE</b>	<b>CRITERIO</b>	<b>INDICADOR</b>	<b>VALOR</b>
<b>Evaluación de la técnica mediante parámetros de desempeño.</b>	Especificidad	Probabilidad de clasificar a una persona sin el polimorfismo G1691A de manera correcta.	95-100% 90-95% 85-90%	-Excelente -Muy buena -Buena
	Sensibilidad	Probabilidad de clasificar a un paciente con el polimorfismo G1691A de manera correcta.	95-100% 90-95% 85-90%	-Excelente -Muy buena -Buena
	Exactitud diagnóstica	Proporción de resultados detectados correctamente como positivos y negativos.	95-100% 90-95% 85-90%	-Excelente -Muy buena -Buena
	Límite de detección	Concentración de ADN más baja que puede ser detectado.	300 ng/μl 150 ng/μl 75 ng/μl 37.5 ng/μl 18.75 ng/μl 9.38 ng/μl 4.69 ng/μl 2.34 ng/ 1.17 ng/μl 0.59 ng/μl	-Detectado -No detectado.
	Repetibilidad	Un mismo operario al realizar la técnica bajo las mismas condiciones, obtendrá los mismos resultados.	95-100% 90-95% 85-90%	-Excelente -Muy buena -Buena
	Reproducibilidad	Independientemente del operario, corrida e intervalo de tiempo transcurrido, los resultados serán los mismos.	95-100% 90-95% 85-90%	-Excelente -Muy buena -Buena
<b>Detección del FVL utilizando PCR-RFLP.</b>		Visualización de banda en gel de electroforesis según genotipo del individuo.	Homocigoto	Banda de 209 bp.
			Heterocigoto	Banda de 209 bp y 241 bp.
			Individuo sin el polimorfismo	Banda de 241 bp.

## 10. RESULTADOS

### 10.1. Estandarización de Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final para la amplificación del factor V de coagulación.

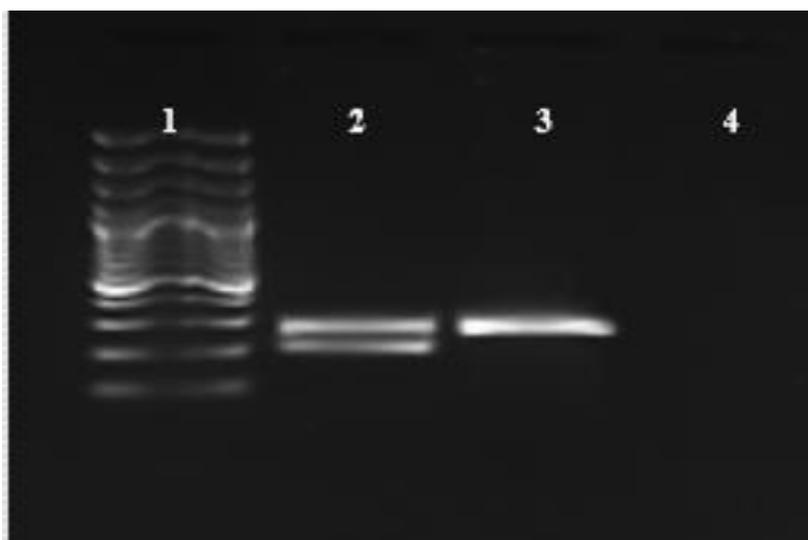
*Ensayo No. 1:* se realizó PCR punto final, con master mix compuesto de 5  $\mu$ l de buffer Y 10x (2mM de  $MgCl_2$ ), 10  $\mu$ l de enhancer 5x, 1  $\mu$ l de mix de dNTPs, 1.5  $\mu$ l de primers forward 10x para FV, 1.5  $\mu$ l de primers reverse 10x para FV, 0.5  $\mu$ l de Taq Polimerasa (2.5 UI), el equivalente a 300 ng/ $\mu$ l de ADN y la cantidad de agua grado reactivo necesaria para la obtención de un volumen final de 50  $\mu$ l en cada reacción. El perfil de temperatura programado para amplificar el FV se estableció, de acuerdo con el documento de referencia, en un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, luego 40 ciclos de amplificación, donde cada uno constó de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C. Finalizando con una extensión a 72°C durante 5 minutos y un enfriamiento a 4°C por tiempo indefinido (ver Figura No. 6).



**Figura No. 6:** *Ensayo No. 1 para estandarización de PCR punto final para amplificación del gen que codifica para el factor V de coagulación.* Se observan fragmentos de 241 bp correspondientes a los controles positivos y no mutados procesados, el cual es el tamaño esperado para el amplicón generado por los primers utilizados, indicando esto el adecuado funcionamiento de los mismos. 1) Marcador de peso molecular de 100 bp. 2) CP H7199. 3) CNM X1149. 4) CN. **Fuente:** Bitácora de trabajo (ver Anexos No.5).

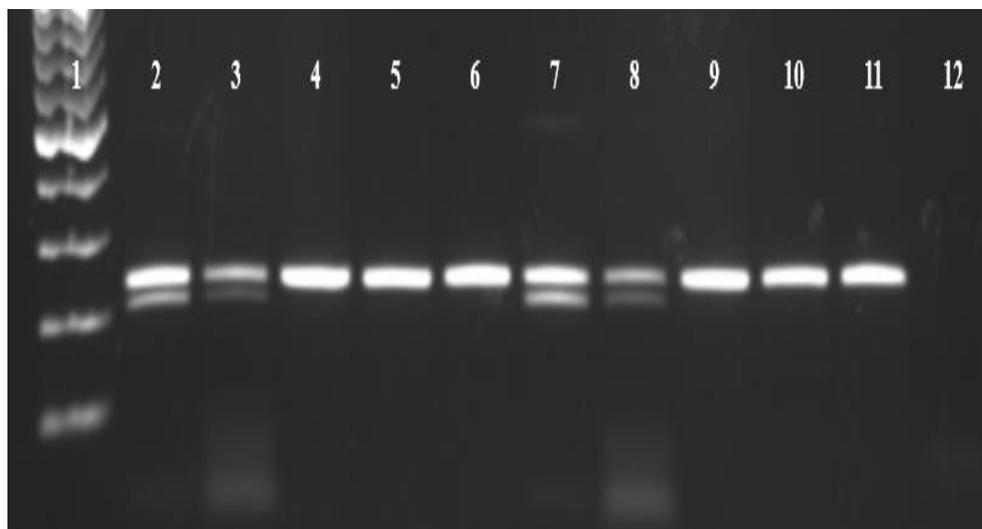
### 10.2. Estandarización de digestión de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica y electroforesis en gel de agarosa para la detección del Factor V Leiden.

*Ensayo No. 2:* se realizó digestión con la enzima de restricción *Hind III*, con master mix compuesto por 26  $\mu$ l de producto amplificado, 3  $\mu$ l de buffer 10x y 1  $\mu$ l de enzima *Hind III* para la obtención de un volumen final de 30  $\mu$ l en la reacción. Se incubó por 2 horas. La inactivación de la enzima se logró a 80°C durante 20 minutos. Se utilizó gel de agarosa al 3% teñido con 4  $\mu$ l de bromuro de etidio. Se cargaron en los pozos, 3  $\mu$ l de ladder (100 bp) más 1  $\mu$ l de loading buffer 6x para el marcador de peso molecular. Para el control positivo, no mutado y negativo se usaron 8  $\mu$ l de producto digerido con 2  $\mu$ l de loading buffer dye purple 6x. Se aplicó un potencial eléctrico de 120 voltios durante 1 hora (ver Figura No. 7).



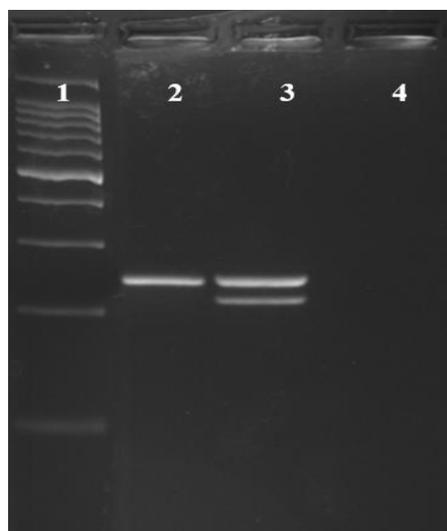
**Figura No. 7:** *Ensayo No. 2 para estandarización de digestión de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica y electroforesis en gel de agarosa para la detección del FVL.* Se observa un control positivo con fragmentos de 241 y 209 bp, así como un control no mutado de 241 bp. Las bandas de ADN del marcador de peso molecular y del control positivo no se separaron lo suficiente. 1) Marcador de peso molecular de 100 bp 2) CP H7199. 3) CNM X1405 4) CN. **Fuente:** Bitácora de trabajo (ver Anexos No. 5).

*Ensayo No. 3:* se realizó digestión con la enzima *Hind III*, con master mix compuesto por 25  $\mu$ l de producto amplificado, 4.5  $\mu$ l de buffer 10x y 0.5  $\mu$ l de *Hind III* para obtención de un volumen final de 30  $\mu$ l. Se incubaron 15  $\mu$ l por 3 horas (alícuota No. 1) y los restantes 15  $\mu$ l se incubaron durante toda la noche (alícuota No. 2), ambas seguidas de inactivación de la enzima a 80°C por 20 minutos. En cuanto a la electroforesis en gel de agarosa, las cantidades de materiales usados y las condiciones de electroforesis no se modificaron, a excepción del tiempo de corrida electroforética, que en este ensayo fue de 1 hora y 20 minutos (ver Figura No. 8).



**Figura No. 8: Ensayo No. 3 para estandarización de digestión de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica y electroforesis en gel de agarosa para la detección del FVL.** Se realizó comparación de distintos tiempos de incubación de la enzima de restricción (3 y 12 horas), sin mostrar diferencias significativas en la calidad de las bandas de ADN. Además, aunque en este ensayo se redujo a la mitad la cantidad de enzima *Hind III* usada se observa que no se comprometió el rendimiento de la reacción. Se mejoró considerablemente la separación de las bandas del marcador de peso molecular y del control positivo. 1) Marcador de peso molecular de 100 bp. 2) CP H7199/ Incubación por 3 horas. 3) CP H7123/ Incubación por 3 horas. 4) CNM X1405/ Incubación por 3 horas. 5) CNM X1905/ Incubación por 3 horas. 6) CNM X4905/ Incubación por 3 horas. 7) CP H7199/ Incubación por 12 horas. 8) CP H7123/ Incubación por 12 horas. 9) CNM X1405/ Incubación por 12 horas. 10) CNM X1905/ Incubación por 12 horas. 11) CNM X4905/ Incubación por 12 horas. 12) CN / Incubación por 12 horas. **Fuente:** Bitácora de trabajo (ver Anexos No.5).

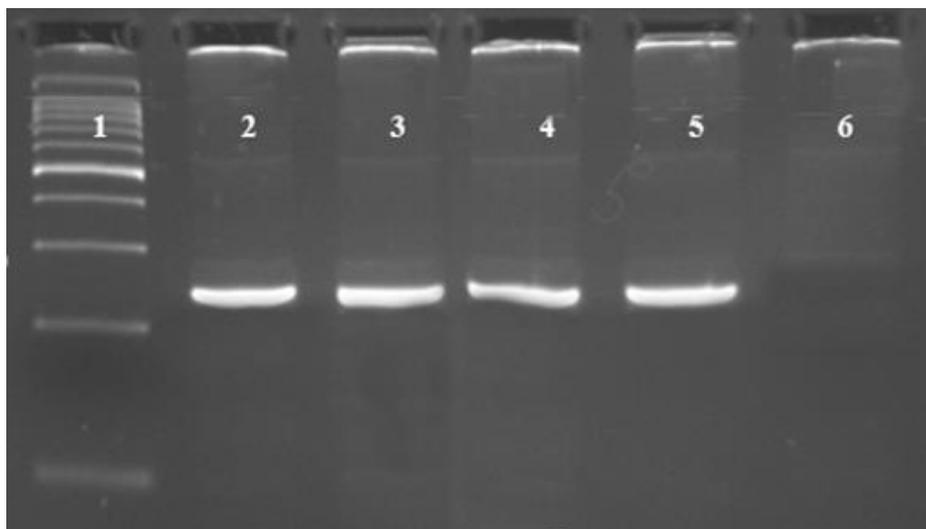
**Ensayo No. 4:** se realizó digestión con la enzima de restricción *Hind III* y electroforesis, con cantidades de reactivos y condiciones establecidas en el ensayo anterior, a excepción del tiempo de corrida electroforética que en este experimento fue de 1 hora y 40 minutos (ver Figura No. 9).



**Figura No. 9: Ensayo No. 4 para estandarización de la electroforesis en gel de agarosa para la detección del FVL.** Se observa una óptima separación de las bandas del marcador de peso molecular y del control positivo. 1) Marcador de peso molecular de 100 bp. 2) CNM X1405. 3) CP H7199. 4) CN. **Fuente:** Bitácora de trabajo (ver Anexos No. 5).

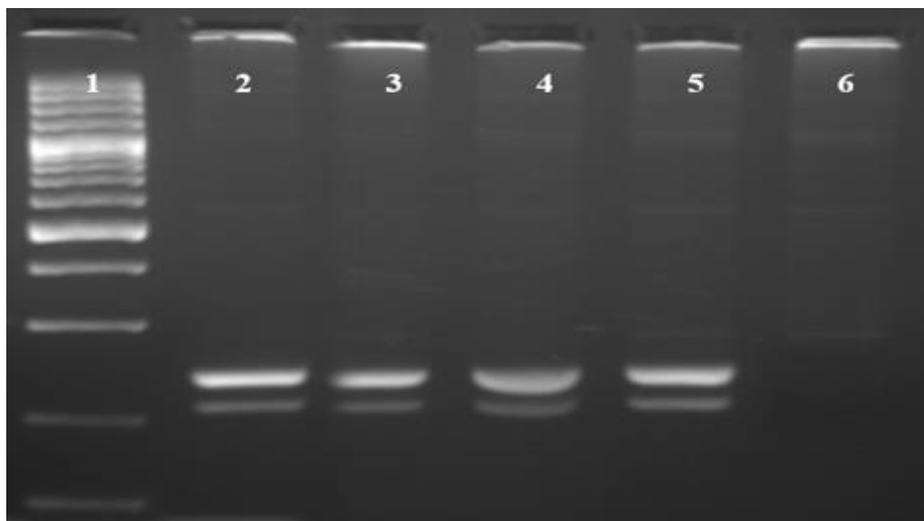
### 10.3. Evaluación de los parámetros de calidad del desempeño de la técnica.

*Ensayo No. 5:* se evaluó especificidad, para ello se procesaron los controles no mutados X1405, X1905, X4905 y X1149 (previamente determinados por un laboratorio de referencia como negativos para el polimorfismo G1691A), esto utilizando las cantidades de reactivos y condiciones ya estandarizadas (ver Figura No. 10).



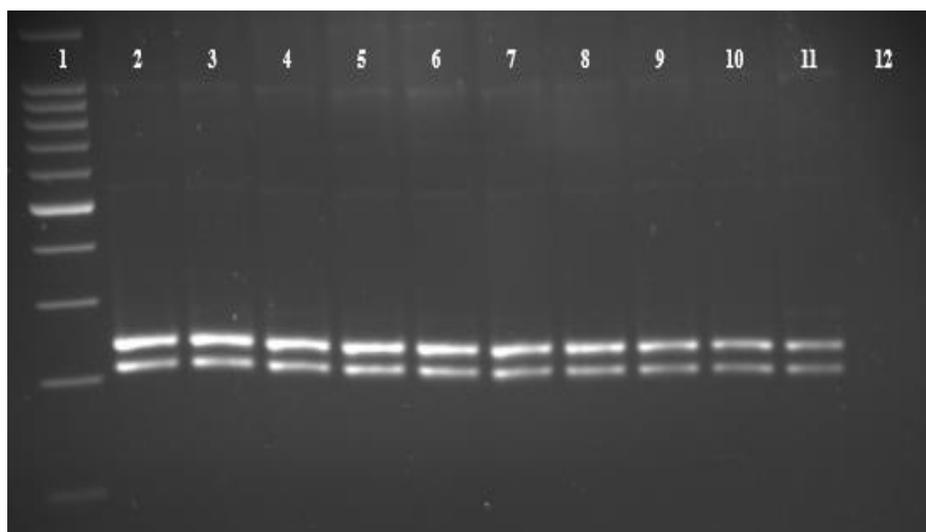
**Figura No. 10: Ensayo No. 5 para evaluación de la especificidad.** Se observan controles no mutados procesados por un laboratorio de referencia obteniendo resultados negativos por la técnica en estandarización. 1) Marcador de peso molecular de 100 bp. 2) CNM X1405. 3) CNM X1905. 4) CNM X4905. 5) CNM X1149. 6) CN. **Fuente:** Bitácora de trabajo (ver Anexos No.5).

*Ensayo No. 6:* se evaluó sensibilidad, para ello se procesaron los controles positivos H7123, H7199, H6295 y N1048 (previamente determinados por un laboratorio de referencia como positivos para el polimorfismo G1691A), esto utilizando las cantidades de reactivos y condiciones ya estandarizadas (ver Figura No. 11).



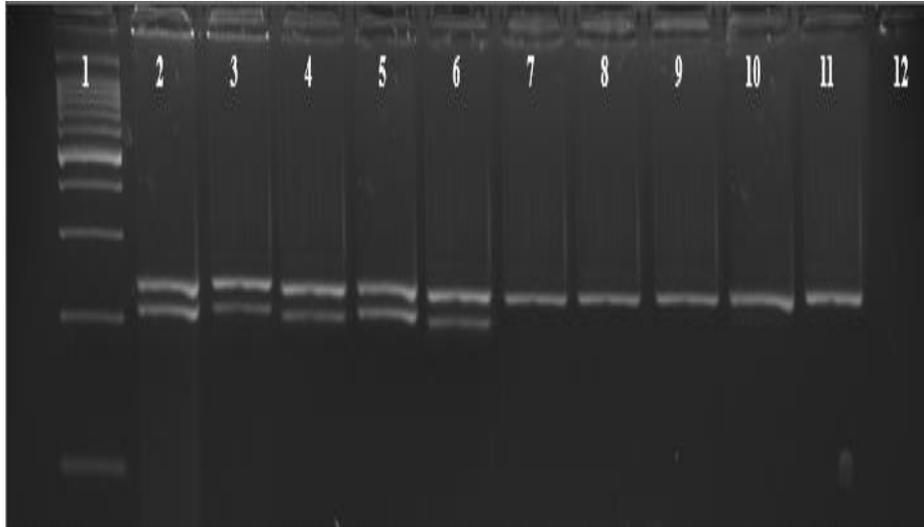
**Figura No. 11: Ensayo No. 6 para evaluación de la sensibilidad.** Se observan controles positivos procesados por un laboratorio de referencia obteniendo resultados positivos por la técnica en estandarización. 1) Marcador de peso molecular de 100 bp. 2) CP H7123. 3) CP H7199. 4) CP H6295. 5) CP N1048. 6) CN. **Fuente:** Bitácora de trabajo (ver Anexos No.5).

*Ensayo No. 7:* se evaluó el límite de detección de la técnica para ello se realizaron diluciones seriadas dobles del control positivo H7123 a las siguientes concentraciones 300 ng/μl (1:1), 150 ng/μl (1:2), 75 ng/μl (1:4), 37.5 ng/μl (1:8), 18.75 ng/μl (1:16), 9.38 ng/μl (1:32), 4.69 ng/μl (1:64), 2.34 ng/μl (1:128), 1.17 ng/μl (1:256) y 0.59 ng/μl (1:512). Dichas diluciones se procesaron utilizando las cantidades de reactivos y condiciones ya estandarizadas (ver Figura No. 12).



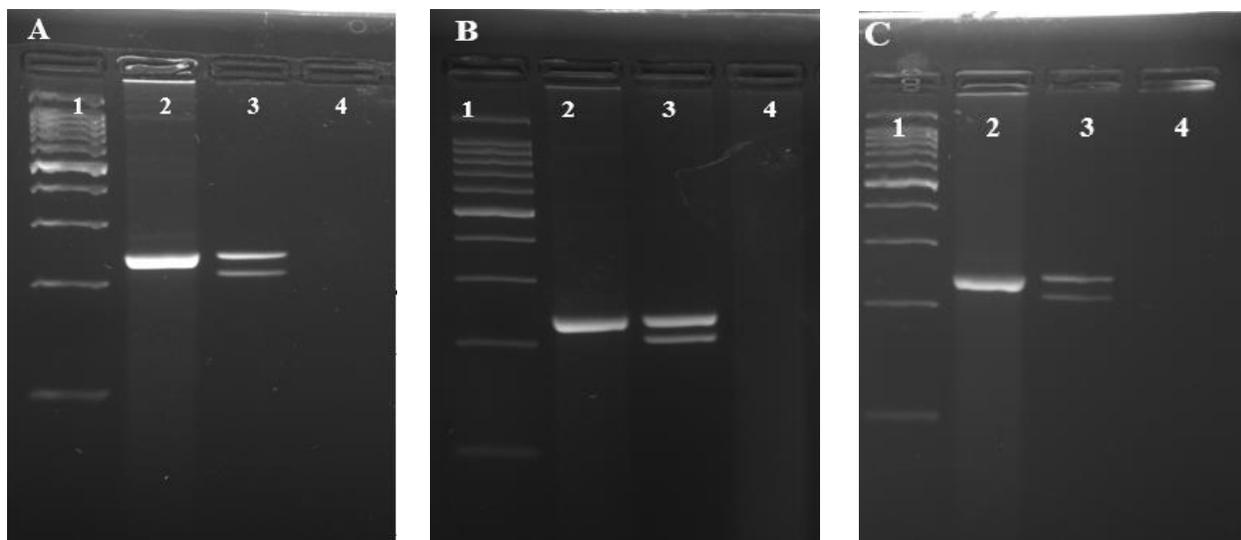
**Figura No. 12: Ensayo No. 7 para evaluación del límite de detección.** Se observan diluciones de control positivo obteniendo un resultado que puede ser interpretado como positivo incluso a bajas concentraciones de ADN. No es posible determinar cuál es la mínima concentración de ADN que puede ser detectada por la técnica en estandarización. 1) Marcador de peso molecular de 100 bp. 2) CP H7123 (300 ng/μl). 3) CP H7123 (150 ng/μl). 4) CP H7123 (75 ng/μl). 5) CP H7123 (37.5 ng/μl). 6) CP H7123 (18.75 ng/μl). 7) CP H7123 (9.38 ng/μl). 8) CP H7123 (4.69 ng/μl). 9) CP H7123 (2.34 ng/μl). 10) CP H7123 (1.17 ng/μl). 11) CP H7123 (0.59 ng/μl). 12) CN. **Fuente:** Bitácora de trabajo (ver Anexos No.5).

*Ensayo No. 8:* se evaluó repetibilidad para ello se procesó 5 veces el control positivo N1048 y el control no mutado X1905. Dicho análisis se llevó a cabo en una misma corrida por un mismo operario (ver Figura No. 13).



**Figura No. 13: Ensayo No. 8 para evaluación de repetibilidad.** Se observa que los controles positivos y no mutados son repetibles cuando se procesan con la técnica estandarizada. 1) Marcador de peso molecular de 100 bp. 2) CP N1048. 3) CP N1048. 4) CP N1048. 5) CP N1048. 6) CP N1048. 7) CNM X1905. 8) CNM X1905. 9) CNM X1905. 10) CNM X1905. 11) CNM X1905. 12) CN. **Fuente:** Bitácora de trabajo (ver Anexos No. 5).

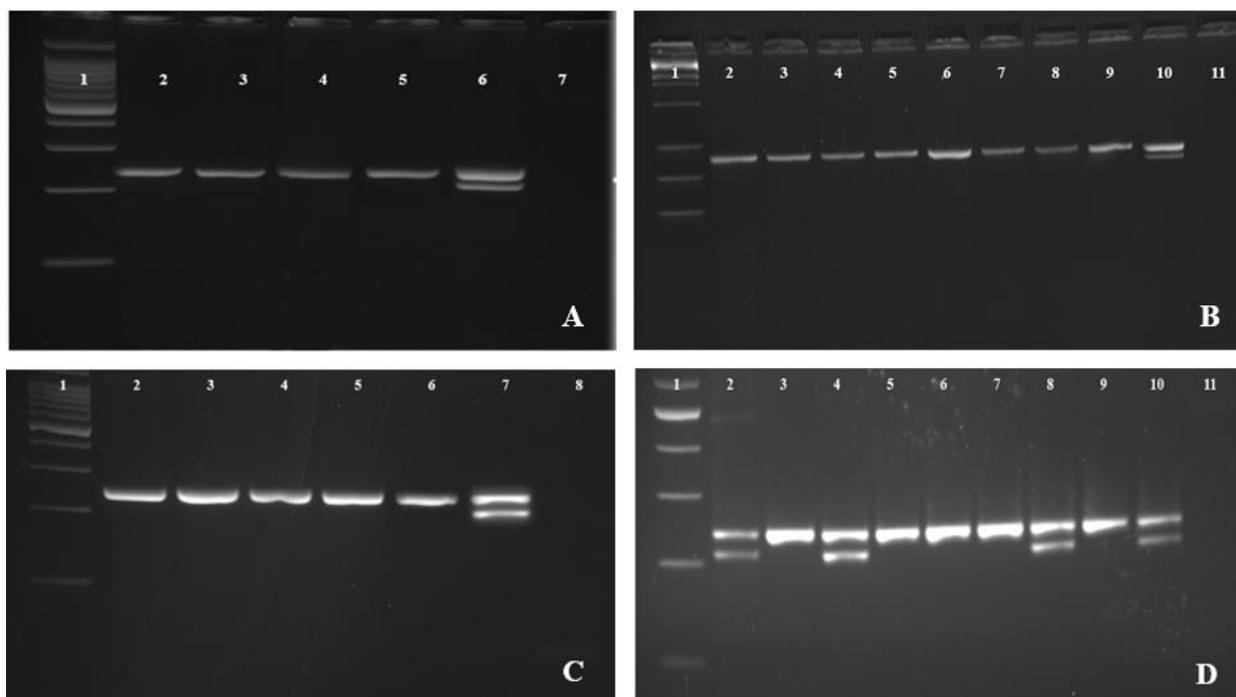
*Ensayo No. 9:* se evaluó reproducibilidad para ello se procesó el control no mutado X1405 y el control positivo H7199, por tres diferentes operarios (A, B y C), en distintas corridas y días (ver Figura No. 14).



**Figura No. 14: Ensayo No. 9 para evaluación de reproducibilidad.** Se observa que los controles positivos y no mutados son reproducibles cuando se procesan con la técnica estandarizada. 1) Marcador de peso molecular de 100 bp. 2) CNM X1405. 3) CP H7199. 4) CN. **Fuente:** Bitácora de trabajo (ver Anexos No.5).

#### 10.4. *Detección del Factor V Leiden en pacientes con trombosis venosa mediante la técnica molecular estandarizada.*

*Ensayo No. 10:* se procesaron en cuatro diferentes corridas electroforéticas (A, B, C y D) a los pacientes FVL-01 al FVL-21 utilizando el protocolo de trabajo de la técnica estandarizada (ver Figura No. 15).



**Figura No. 15:** *Ensayo No. 10 para la detección del FVL en pacientes con Trombosis Venosa Profunda atendidos en el Hospital Escuela “Roberto Calderón” durante el periodo comprendido entre julio a septiembre de 2017.* Se observan los resultados obtenidos en cuatro diferentes corridas electroforéticas (A, B, C y D), detectándose tres pacientes portadores de FVL (Px 15, 17 y 21) todos con genotipo heterocigoto. **A.** 1) Marcador de peso molecular de 100 bp. 2) Px FVL-01. 3) Px FVL-02. 4) Px FVL-03. 5) CNM X1405. 6) CP H7199. 7) CN. **B.** 1) Marcador de peso molecular de 100 bp. 2) Px FVL-04. 3) Px FVL-05. 4) Px FVL-06. 5) Px FVL-07. 6) Px FVL-08. 7) Px FVL-09. 8) Px FVL-10. 9) CNM X1405. 10) CP H7199. 11) CN. **C.** 1) Marcador de peso molecular de 100 bp. 2) Px FVL-11. 3) Px FVL-12. 4) Px FVL-13. 5) Px FVL-14. 6) CNM X1405. 7) CP H7199. 8) CN. **D.** 1) Marcador de peso molecular de 100 bp. 2) Px FVL-15. 3) Px FVL-16. 4) Px FVL-17. 5) Px FVL-18. 6) Px FVL-19. 7) Px FVL-20. 8) Px FVL-21. 9) CNM X1405. 10) CP H7123. 11) CN. **Fuente:** Bitácora de trabajo (ver Anexos No.5).

## 11. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 11.1. Estandarización de Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final para la amplificación del factor V de coagulación.

La estandarización de la PCR para la amplificación del factor V de coagulación requirió de un solo ensayo, en el que se siguió la metodología descrita por Huber *et al.* (2000), el cual es el documento de referencia de este trabajo monográfico.

Los resultados del Ensayo No. 1 fueron satisfactorios pues hubo ausencia de banda de ADN en el control negativo, así como controles no mutados y positivos que presentaron bandas con tamaños que coincidieron con los fragmentos de 241 bp esperados para el amplicón generado por los oligonucleótidos utilizados según el protocolo descrito por el documento de referencia. No se observaron formación de dímeros u horquillas de cebadores, es decir, productos inespecíficos, por tanto, la interpretación de los resultados pudo realizarse sin interferencia alguna.

De este modo, se pudo constatar que las cantidades y concentraciones de reactivos, programa de PCR y oligonucleótidos definidos por Huber *et al.* (2000) son idóneos para la amplificación de la región diana del exón No. 10 del gen que codifica para el factor V de coagulación y dentro del cual se encuentra el polimorfismo G1691A que solo puede ser identificado en un posterior paso de digestión con una enzima de restricción que permite detectar el cambio de base correspondiente y que es motivo de análisis en el segundo objetivo de esta investigación.

### 11.2. Estandarización de digestión de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica y electroforesis en gel de agarosa para la detección del Factor V Leiden.

El polimorfismo G1691A constituye el cambio de base de una guanina por una adenina en la posición 1691 del gen F5, esta ubicación se encuentra dentro del amplicón de 241 bp generado por los oligonucleótidos utilizados en la PCR para la amplificación del FV. La enzima de digestión *Hind III* tiene una secuencia palindrómica de reconocimiento con los siguientes nucleótidos: AAGCTT (A en cursiva corresponde al nucleótido No. 209 del amplicón generado por la PCR) si dicha secuencia está presente, se origina un corte de extremos cohesivos que da lugar a dos fragmentos de ADN, así pues cuando el individuo tiene el gen silvestre el nucleótido de la posición 209 es una guanina, por tanto, *Hind III* no realiza ningún corte en el ADN amplificado, debido a

que la secuencia de reconocimiento no existe en el amplicón. Pero si el individuo posee el polimorfismo y en la posición 209 del amplicón o lo que es igual posición 1691 del gen F5 existe una adenina, entonces se forma la secuencia de reconocimiento de *Hind III* lo cual ocasiona que el fragmento de 241 bp se divida en dos fragmentos de 209 bp y 32 bp, respectivamente.

Ahora bien, la estandarización de la digestión de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica para la detección del Factor V Leiden requirió de tres ensayos, en cada uno de estos se realizaron modificaciones con respecto al protocolo estipulado en el documento de referencia.

En el Ensayo No. 2 se usaron las cantidades de reactivos y condiciones de digestión, así como la concentración del gel de agarosa descritas por Huber *et al.* (2000). Los resultados obtenidos fueron un control positivo con fragmentos de 241 bp y 209 bp lo cual es lo esperado para un genotipo heterocigoto, el control no mutado presentó solamente un fragmento de 241 bp indicando así la ausencia del polimorfismo G1691A, el control negativo reflejó ausencia de banda de ADN.

Se pudo apreciar que el marcador de peso molecular no migró lo suficiente como para que cada una de las bandas se observaran separadas adecuadamente (esto también había sucedido en el Ensayo No. 1, sin embargo, no se realizaron las modificaciones pertinentes hasta ahora debido a que la estandarización de la electroforesis no era de interés en el objetivo No. 1 de la investigación), la medida a ejecutar para la mejora de este aspecto correspondió a aumentar el tiempo de corrida electroforética.

En el Ensayo No. 3 se modificaron las cantidades de reactivos para la digestión con enzima de restricción, esto con el propósito de ensayar si era posible optimizar el uso de *Hind III*, reduciendo de 1 µl a 0.5 µl la cantidad de enzima utilizada en cada reacción, para compensar la disminución de la cantidad de enzima y así mantener el volumen final de la reacción (definido en 30 µl por el documento de referencia) se decidió aumentar la cantidad de buffer a 4.5 µl (definido en 3 µl por el documento de referencia). También tomando en cuenta que en la reacción habría menor cantidad de enzima disponible para digerir el ADN se estimó conveniente aumentar el tiempo de incubación de la reacción hasta 3 horas (definido en 2 horas por el documento de referencia). En este ensayo, el volumen final de la reacción se dividió en dos alícuotas, cada una de 15 µl, esto con el fin de experimentar los dos diferentes tiempos de incubación descritos por Huber *et al.* (2000), por tanto, una alícuota se incubó durante 3 horas y la otra durante toda la noche (*overnight*). En cuanto al

protocolo de la electroforesis la modificación que se realizó fue aumentar el tiempo de corrida a 1 hora y 20 minutos.

Los resultados obtenidos fueron controles positivos y no mutados que presentaron los fragmentos esperados para el ensayo, en el control negativo hubo ausencia de banda de ADN. Al comparar la corrida electroforética obtenida en este ensayo con la del ensayo anterior (Ensayo No. 2), se puede asegurar que no existe una diferencia significativa en el rendimiento de la reacción que interfiera en la interpretación de las bandas de ADN cuando se usa 1  $\mu$ l o 0.5  $\mu$ l de *Hind III*, pues en ambas la actividad de la enzima es lo suficiente como para permitir la digestión del material genético. De igual modo, al comparar los resultados de los controles incubados durante 3 horas y los que tuvieron un tiempo de incubación de 12 horas, se encontró que tampoco existía una diferencia que interfiriera en la interpretación de los resultados, en ambos casos los controles positivos incubados carecían de digestiones inespecíficas.

La totalidad de las modificaciones realizadas en el protocolo de digestión con la enzima de restricción se consideraron satisfactorias por lo que se estipuló como el protocolo a seguir en las posteriores digestiones. Con respecto al aumento del tiempo de corrida electroforética, se consideró que la separación de las bandas del marcador de peso molecular mejoró en comparación con el ensayo anterior.

En el Ensayo No. 4 el tiempo de corrida electroforética se aumentó, esta vez hasta 1 hora y 40 minutos, con lo que se obtuvo una separación de las bandas del marcador de peso molecular y del control positivo aún mejor que la alcanzada en el ensayo anterior (Ensayo No. 3), por lo que se facilitó la verificación del peso molecular de los fragmentos esperados. Así pues, el tiempo de corrida en este ensayo se consideró óptimo y se estipuló como el protocolo a seguir en las posteriores electroforesis.

### ***11.3. Evaluación de los parámetros de calidad del desempeño de la técnica.***

Con la finalidad de garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos con la técnica estandarizada resultó necesaria la evaluación de los parámetros de calidad del desempeño de la técnica lo cual requirió de cinco diferentes ensayos.

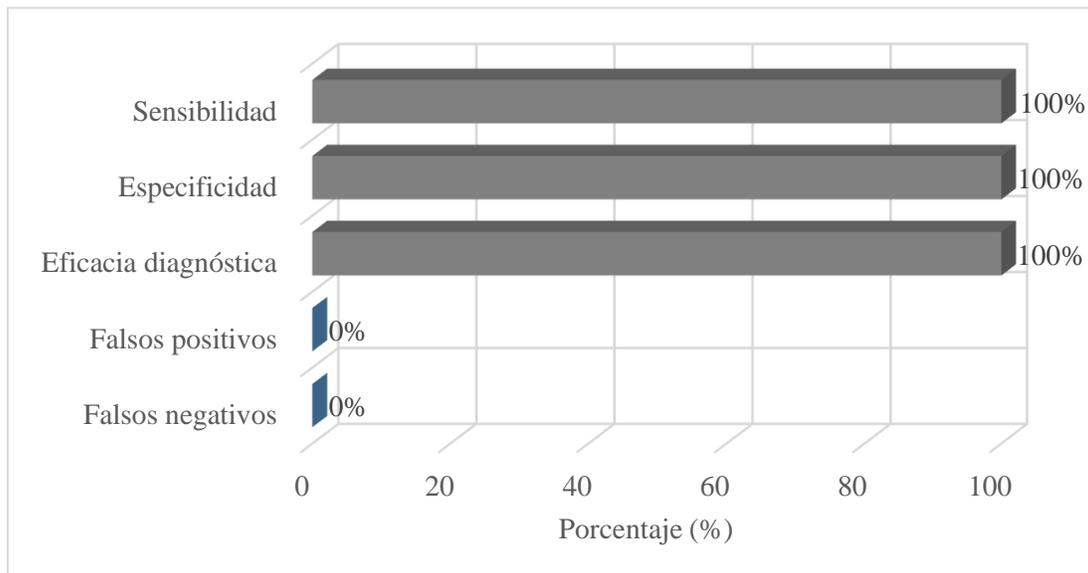
En el Ensayo No. 5 se realizó el procesamiento de controles no mutados conocidos como negativos para el polimorfismo G1691A según un laboratorio de referencia, obteniéndose en el ensayo

realizado resultados igualmente negativos en cada uno de los controles, por tanto, los datos reflejan que la técnica es 100% específica para el polimorfismo G1691A, pues permite detectar muestras negativas cuando realmente son negativas.

Por otra parte, en el Ensayo No. 6 se realizó el procesamiento de controles positivos conocidos como positivos para el polimorfismo G1691A por un laboratorio de referencia, obteniéndose en el ensayo realizado resultados igualmente positivos, en cada uno de los controles, por tanto, los datos reflejan que la técnica es 100% sensible para el polimorfismo G1691A, pues permite detectar muestras positivas cuando realmente son positivas.

Así pues, con los datos obtenidos en los Ensayos No. 5 y 6 fue posible conocer que la eficacia diagnóstica fue igualmente del 100%, esto indica que la totalidad de los resultados obtenidos son acertados y por extensión, válidos. Dicho de otro modo, la probabilidad de que un paciente sea correctamente clasificado con o sin el polimorfismo G1691A es del 100%.

Cabe recalcar que al realizar el procesamiento de los controles positivos y no mutados no se presentaron casos de falsos positivos o negativos, es decir, no hubo discrepancias entre los resultados emitidos por el laboratorio de referencia y los obtenidos en este ensayo cuando se procesó el mismo material genético mediante la técnica en estandarización.

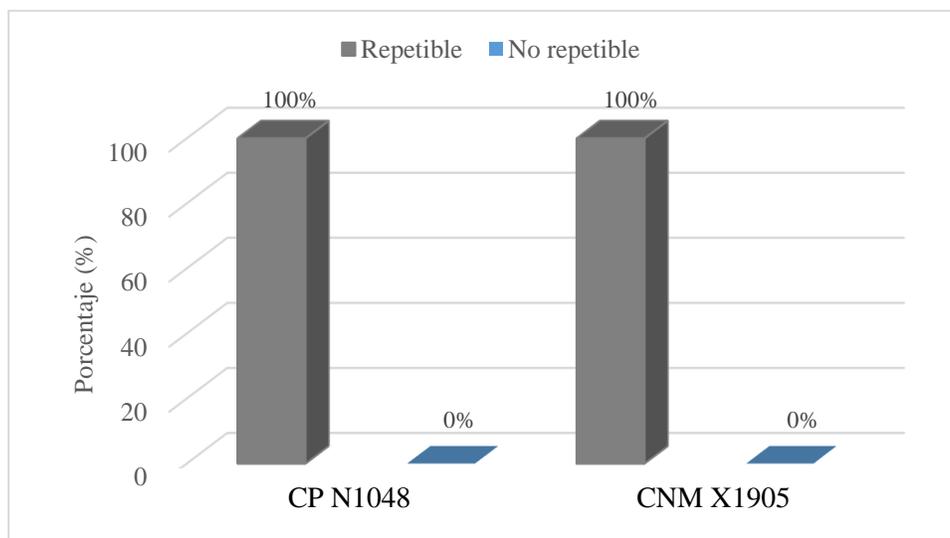


**Gráfico No 1: Evaluación de sensibilidad, especificidad, eficacia diagnóstica, falsos positivos y falsos negativos.** El resultado obtenido al evaluar los parámetros de calidad para técnicas diagnósticas cualitativas determina que la PCR-RFLP estandarizada tiene un desempeño excelente. **Fuente:** Tabla No. 1.

En el Ensayo No. 7 se realizaron diluciones seriadas dobles de un control positivo que iban desde 300 ng/μl hasta 0.59 ng/μl esto con la finalidad de determinar el límite de detección de la técnica en estandarización. Como resultado se obtuvo que no fue posible determinar el límite de detección, puesto que no se obtuvo la concentración de ADN necesaria para que una muestra con el polimorfismo G1691A no pudiese ser detectada por la técnica estandarizada.

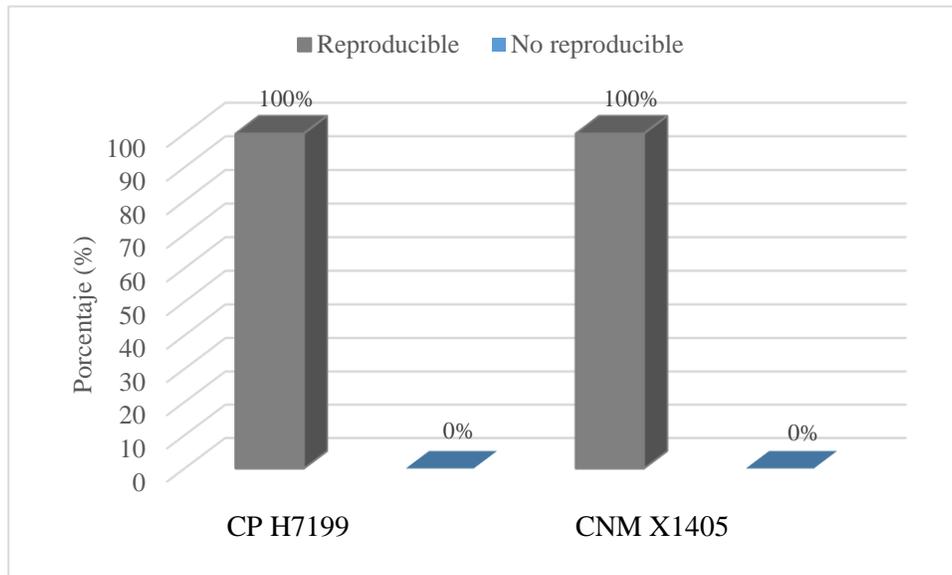
Sin embargo, se puede afirmar que dicho límite de detección es inferior a 0.59 ng/μl y debido a que en condiciones de rutina es poco probable procesar muestras con tan poca concentración de ADN, se tiene la certeza de que la técnica molecular estandarizada emplea una concentración de ADN muy por encima del límite de detección y que por lo tanto, el rendimiento de la técnica no se verá comprometido pues según las condiciones de operación establecidas en la estandarización de la técnica, la concentración de ADN usada en el protocolo de PCR (300 ng/μl) es capaz de generar una respuesta analítica positiva de forma sumamente confiable.

En el Ensayo No. 8 se procesó cinco veces un control positivo y uno no mutado en condiciones de repetibilidad. Los resultados obtenidos corresponden a que no hubo discrepancias al procesar controles en una misma corrida y siendo realizada por un mismo operario. Así, el resultado del control positivo evaluado fue cinco veces positivo para el polimorfismo G1691A, en cambio, el resultado del control no mutado correspondió cinco veces a la de un material genético no mutado, por tanto, se considera que la técnica es 100% repetible.



**Gráfico No 2: Evaluación de repetibilidad.** El resultado obtenido al evaluar la repetibilidad, determinan que la PCR-RFLP estandarizada tiene una precisión excelente en condiciones de repetibilidad. **Fuente:** Tabla No. 2.

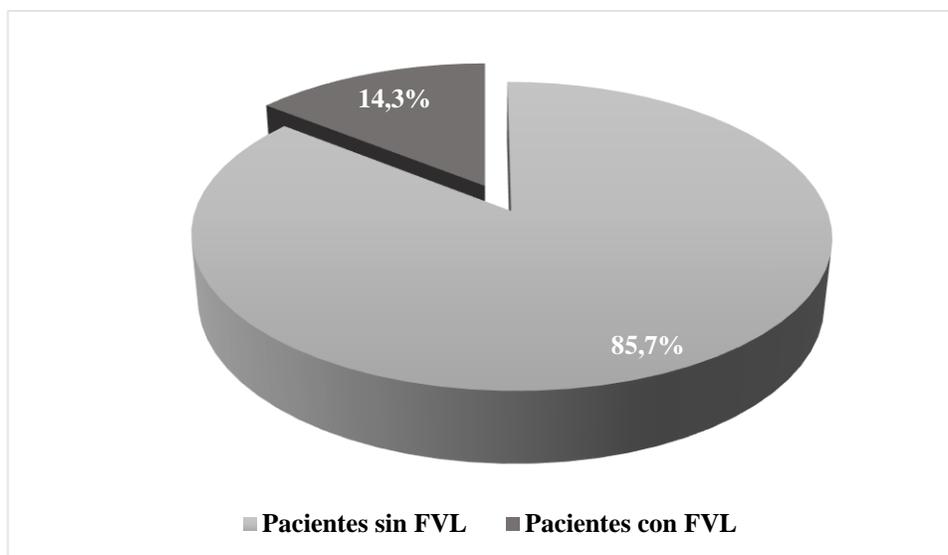
En el Ensayo No. 9 se procesó un control positivo y uno no mutado en condiciones de reproducibilidad. El resultado del control positivo evaluado fue tres veces positivo para el polimorfismo G1691A, en cambio, el resultado del control no mutado correspondió tres veces a la de un material genético no mutado, independientemente de que los resultados hayan sido procesados en distintas corridas, días y por diferentes operarios, por tanto, se puede afirmar que la técnica es 100% reproducible.



**Gráfico No 3: Evaluación de reproducibilidad.** El resultado obtenido al evaluar la reproducibilidad, determinan que la PCR-RFLP estandarizada tiene una precisión excelente en condiciones de reproducibilidad. **Fuente:** Tabla No. 3.

#### 11.4. *Detección del Factor V Leiden en pacientes con trombosis venosa mediante la técnica molecular estandarizada.*

En el Ensayo No. 10 se procesaron 21 muestras sanguíneas de pacientes con diagnóstico de TVP de origen idiopática atendidos en el Hospital Escuela “Roberto Calderón” durante el periodo comprendido entre julio a septiembre del 2017, las cuales fueron referidas al Laboratorio de Biología Molecular MA. “Elmer Cisneros” *in memoriam* para su debido análisis molecular mediante la técnica estandarizada.



**Gráfico No 4:** Resultados obtenidos mediante la detección del FVL en pacientes con Trombosis Venosa Profunda de origen idiopática atendidos en el Hospital Escuela “Roberto Calderón” durante el periodo comprendido entre julio a septiembre de 2017. Se detectó el FVL en un 14.3% de la población en estudio el 85.7% restante de los pacientes no presentó FVL. *Fuente:* Tabla No. 4.

En la muestra en estudio se detectó FVL en un 14.3% (3 pacientes; 2 del sexo femenino y 1 masculino), el restante 85.7% (18 pacientes) no presentaron FVL (ver Gráfico No. 4).

Así pues, el 14.3% de los pacientes presentó el polimorfismo G1691A, la cual es la alteración genética que los predispone al desarrollo de eventos tromboticos, específicamente a episodios de TVP. El porcentaje encontrado por esta investigación es menor a la reportada por la literatura mundial, la cual establece que un 20-40% de los pacientes con trombosis venosa presentan FVL (Zalabegui, 2010). De modo parecido, la cantidad de pacientes con FVL encontrado en este estudio es menor que lo reportado en Colombia por García (2011), donde se obtuvo un 17% de positividad en individuos con susceptibilidad a trombofilia, así como lo encontrado por López *et al.* (2007) en Venezuela en donde se encontraron 18% de pacientes con tromboembolismo venoso que presentaban la alteración genética, pero es mayor que lo reportado en Chile por Venegas *et al.* (2006), en donde solo un 6% de personas con trombosis venosa presenta FVL. Estas diferencias en los porcentajes de pacientes afectados con el polimorfismo pueden deberse a diversas causas que incluyen las siguientes:

- La muestra no fue lo suficientemente representativa.

- Los criterios de inclusión de la muestra no fueron lo suficientemente discriminatorios como para seleccionar a los pacientes que tenían las mayores probabilidades de presentar la alteración genética.
- La población nicaragüense presenta una menor predisposición a poseer el polimorfismo G1691A, dicho argumento, en caso de ser efectivamente cierto, podría estar relacionado con el factor racial, ya que FVL es más prevalente en poblaciones caucásicas (López *et al.* 2007), por lo que, en países con poblaciones mestizas como Nicaragua, podrían esperarse menores porcentajes de pacientes afectados con el polimorfismo.

Por otro lado, la totalidad de estos pacientes con FVL presentaron un genotipo heterocigoto, lo cual incrementa el riesgo trombótico 6-8 veces más, en comparación con aquellos con Factor V normal. Es importante mencionar que, por tratarse de una enfermedad multifactorial, el riesgo al desarrollo de trombosis aumenta cuando FVL va acompañada de algún otro factor, ya sea genético o adquirido (embarazo, cirugía, inmovilización, toma de anticonceptivos orales, entre otros).

De los tres pacientes positivos para el polimorfismo, todos presentaban antecedentes familiares que sugerían historial de trombosis. En ninguno de los tres se pudo identificar factores de riesgo o enfermedad de base como detonante para los eventos trombóticos que habían padecido. El individuo del sexo masculino, tenía 55 años de edad con al menos tres eventos de TVP durante su vida y uno de tromboembolismo pulmonar. Las dos pacientes del sexo femenino tenían 19 y 46 años de edad, con dos y cuatro eventos trombóticos respectivamente, ambas sin antecedentes de pérdida gestacional y la de 46 años con historial de un tromboembolismo pulmonar. Esta información se encuentra en concordancia con lo estipulado en la literatura acerca del hecho de que la presencia del polimorfismo G1691A se asocia a historial familiar de trombosis, recurrencia de los eventos trombóticos y manifestación de tromboembolismo pulmonar como complicación de TVP.

Con respecto al 85.7% de los pacientes que no presentaron el polimorfismo G1691A, el resultado obtenido permite deducir que la causa de los eventos trombóticos que padecen puede deberse a otra trombofilia hereditaria, pero de epidemiología menos frecuente, tal como la mutación de la protrombina G20210A, la cual registra una frecuencia de hasta el 6% en personas con eventos trombóticos (Conte & Figueroa, 2015). Otras posibles causas incluyen a las trombofilias de origen

adquirido. En cualquiera de estos casos, para encontrar la etiología de la trombosis venosa se requeriría del uso de otras herramientas diagnósticas.

Finalmente, es necesario mencionar que la detección del FVL en pacientes con TVP de causa idiopática que hizo posible este trabajo monográfico, constituyen los primeros reportes del polimorfismo G1691A en Nicaragua, así, la materialización de esta técnica molecular viene a facilitar la labor de los profesionales de la salud implicados en el diagnóstico y tratamiento de coagulopatías como FVL, con el propósito de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

## 12. CONCLUSIONES

- El protocolo de PCR punto final para amplificar el factor V de coagulación se estableció con un master mix compuesto de 5 µl de buffer Y 10x, 10 µl de enhancer 5x, 1 µl de mix de dNTPs, 1.5 µl de primers forward 10x para FV, 1.5 µl de primers reverse 10x para FV, 0.5 µl de Taq Polimerasa (2.5 UI), el equivalente a 300 ng/µl de ADN y la cantidad de agua grado reactivo necesaria para la obtención de un volumen final de 50 µl en cada reacción. El perfil de temperatura se estipuló en un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, para luego 40 ciclos de amplificación, donde cada uno constó de un minuto a 94°C, un minuto a 55°C y un minuto a 72°C. Finalizando con una extensión final a 72°C durante cinco minutos y un enfriamiento a 4°C por tiempo indefinido.
- El protocolo de digestión con la enzima de restricción *Hind III*, se estableció con un master mix compuesto por 25 µl de producto de ADN amplificado, 4.5 µl de buffer 10x y 0.5 µl de enzima *Hind III* para la obtención de un volumen final de 30 µl. El tiempo de incubación puede ser de 3 horas o de 12 horas con posterior inactivación a 80°C durante 20 minutos. La concentración del gel de agarosa fue del 3% teñido con 4 µl de bromuro de etidio, el potencial eléctrico a aplicar es de 120 voltios durante 1 hora y 40 minutos.
- La técnica alcanzó 100% de especificidad, sensibilidad y eficacia diagnóstica. No fue posible determinar el límite de detección, pero se puede afirmar que este es inferior a 0.59 ng/µl y se tiene la certeza de que la técnica emplea una concentración de ADN muy por encima del límite de detección, por lo tanto, el rendimiento de la técnica molecular estandarizada no se ve comprometido. Además, se obtuvo 100% de repetibilidad y reproducibilidad.
- La técnica molecular PCR-RFLP permitió la detección del Factor V Leiden (polimorfismo G1691A) en un 14.3% (3 individuos) de pacientes con Trombosis Venosa Profunda de origen idiopática, todos con genotipo heterocigoto, el restante 85.7% (18 individuos) no presentaron FVL.

### 13. RECOMENDACIONES

Al *Departamento de Bioanálisis Clínico* seguir promoviendo la investigación en el campo de la biología molecular aplicada a la hematología con el propósito de fortalecer el diagnóstico de las enfermedades hematológicas.

Al *Laboratorio de Biología Molecular MA “Elmer Cisneros” in memoriam* incorporar la técnica estandarizada dentro de las pruebas moleculares disponibles para el público.

Al *Hospital Escuela “Roberto Calderón* dar el manejo terapéutico necesario a los pacientes diagnosticados con el polimorfismo G1691A en esta investigación, con la finalidad de evitar la recidiva de los eventos trombóticos en dichos pacientes ahora que se conoce la causa genética de la trombofilia que manifiestan, así como también solicitar la realización de la detección del polimorfismo G1691A en pacientes con diagnóstico de trombosis venosa, con el objetivo de esclarecer la etiología de eventos trombóticos de causa hereditaria.

A los *estudiantes* interesados en el tema en estudio se les insta a realizar estudios sobre la frecuencia del polimorfismo G1691A en la población nicaragüense.

## 14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altuna, D., Ceresetto, J., Fassi, D., Ferro, H., Fondevila, C., Giumelli, C., Maneyro, A. Viñuales, S. (2012). Trombofilias. *Sociedad Argentina de Hematología*, 42 (1) 473,481. Recuperado de: [http://sah.org.ar/docs/471-481.12.SAH\\_GUIA2012\\_Trombofilia.pdf](http://sah.org.ar/docs/471-481.12.SAH_GUIA2012_Trombofilia.pdf)
- Bertina, R., Koeleman, B., Koster, T., Rosendaal, F., Dirven, R., Ronde, H., van der Velden, P. & Reitsma, P. (1994). Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 369 (1), 64-67. Recuperado de: [https://openaccess.leidenuniv.nl/bitstream/handle/1887/1770/303\\_295.pdf%C63.Fb%5E4Z\(u%FD%9EZ%FD'%7D%FD%8CZi%20%C2%5Ew%20CEj%FD%20class=?sequence=1](https://openaccess.leidenuniv.nl/bitstream/handle/1887/1770/303_295.pdf%C63.Fb%5E4Z(u%FD%9EZ%FD'%7D%FD%8CZi%20%C2%5Ew%20CEj%FD%20class=?sequence=1)
- Botella, F., Labiós, M., Portolés, O. & Cabanes, V. (2013). Nuevos avances en el conocimiento del síndrome posttrombótico. *Anales de Medicina Interna*, 20 (9), 483-492. Recuperado de: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-71992003000900010](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992003000900010)
- Botella, G. (2003). Reflexiones sobre la enfermedad tromboembólica venosa. *Anales de Medicina Interna*, 20 (3), pp 447-450. Recuperado de: <http://scielo.isciii.es/pdf/ami/v20n9.pdf>
- Boza, S. (2016). *Fundamentos de la Hematología*. Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica.
- Cardé, J. (2013). *Enzimas de restricción. Genética Molecular*. México. Recuperado de: [http://www.intramed.org.trombofilias\\_diagnostico\\_tratamiento\\_421#234.cardé.html](http://www.intramed.org.trombofilias_diagnostico_tratamiento_421#234.cardé.html)
- Carmona, S., Arroyo, S., Barrio, C., Álvarez, C., Montero, R. & Gesto, G. (2003). Características de la trombosis venosa profunda en pacientes con Factor V Leiden y mutación G20210A del gen de la protrombina. *ANGIOLOGÍA* 55(4), 322-330. Recuperado de: <http://www.elsevier.es/es-revista-angiologia-294-articulo-caracteristicas-trombosis-venosa-profunda-pacientes-S000331700374810X>
- Castañeda, S., Cardona, W. & Cadavid, A. (2012). Trombofilias heredadas y pérdida gestacional recurrente. *IATREIA*, 15 (3), 170-177. Recuperado de: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/download/3956/3671>
- Conte, G. & Figueroa, G. (2015). Hipercoagulabilidad. Hematología. *Bases de la Medicina Clínica. Universidad de Chile*. Recuperado de: [http://www.basesmedicina.cl/hematologia/15\\_10\\_hipercoagulabilidad/15\\_10\\_hipercoagulabilidad.pdf](http://www.basesmedicina.cl/hematologia/15_10_hipercoagulabilidad/15_10_hipercoagulabilidad.pdf)
- Flores, J., Jacobo, S., Segura, R. & Stern, J. (2014). Pacientes con trombofilias hereditarias y pérdida gestacional recurrente: incidencia. *Ginecol Obstet Mex*, 82 (1), 383-388. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2014/gom146d.pdf>

- Flores, O., Ramírez, K., Meza, J. & Nava, J. (2014). Fisiología de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 37 (2), 382-386. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/rma/cma-2014/cmas142c.pdf>
- García, S. (2011). *Análisis mutacional del Factor V Leiden, protrombina G20210A y Metilentetrahidrofolato Reductasa C677T y A1298C en una muestra de pacientes con susceptibilidad a trombofilia*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/6272/1/597837.2011.pdf>
- Gómez, D. & Pérez, J. (2012). *Hematología. La Sangre y sus Enfermedades*. 2<sup>da</sup> ed. México. MCGRAW-HILL.
- Gómez, S., Lozano, F., Alberca, I., López, M. & Gómez, A. (2002). Trombofilias y trombosis venosa profunda, *MAPFRE MEDICINA*, 13(1), 53-66. Recuperado de: <http://sid.usal.es/i/docs/F8/ART8633/trombo.pdf>
- Greatty, O. (2017). *Síndrome post trombótico. Arterias y Venas*. Recuperado de: [http://arteriasyvenas.org/index/sindrome\\_post\\_trombotico/](http://arteriasyvenas.org/index/sindrome_post_trombotico/)
- Hernández, H., Usme, S. & Yunis, J. (2014). Genotipos frecuentemente asociados a trombofilias. *Biomedica*, 34(1),132-142. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v34n1/v34n1a16.pdf>
- Huber, S., McMaster, K. & Voelkerding, K. (2000). Analytical Evaluation of Primer Engineered Multiplex Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism for Detection of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2 (3), 153-157. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1906911/>
- Krämer, A. & Valdés, F. (2015). *Tromboembolismo pulmonar*. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Chile. Recuperado de: <http://medicina.uc.cl/cirugia-vascular/tromboembolismo-pulmonar>
- Lens, D., Otero, A., Cotic, G., Henry, S., Diaz, A., Attarian, D., Agorio, C. & Pierri, S. (2010). Diagnóstico molecular de factores protrombóticos: primeros casos de Factor V Leiden y protrombina 20210A en Uruguay. *Rev Med Uruguay*, 16 (1)39-44. Recuperado de: <http://www.rmu.org.uy/revista/2000v1/art7.pdf&ved=0ahUKEw>
- López, T., Delgado, V., Puentes, D., Araque, W., Rosales, A., Granadillo, A., Rojas, M. & Bimanis, J. (2007). Frecuencia de la mutación del Factor V Leiden y protrombina G2021A en pacientes con tromboembolismo venoso. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud*, 11 (3), 33-41. Universidad de Carabobo. Venezuela. Recuperado de: [http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/leiden\\_protrombina\\_tev.pdf](http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/leiden_protrombina_tev.pdf)

- Martinez, C. & Quintana, S. (2015). Factores de riesgo para trombosis. *Revista de Hematología*, 6 (1)155-159. Recuperado de: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:MDkmfH7SRgcJ:www.amehac.org/wp-content/uploads/2012/07/Rev-Hematol-Mex>
- Martínez, C. (2016). Mecanismos de activación de la coagulación. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 44(2),51-58. Recuperado de: <http://cleuadistancia.cleu.edu.mx/cleu/flash/PAG/lecturas/hematologia/Mecanismos%20de%20activaci%F3pn%20de%20la%20coagulaci%F3n.pdf>
- Mattocks, C., Morris, M., Matthijs, G., Swinnen, E., Corveleyn, A., Dequeker, E., Müller, C., Pratt, V. & Wallace, A. (2010). A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *European Journal of Human Genetics*, 18 (1) 1276-1288. Recuperado de: [http://www.nature.com/ejhg\\_mattocks\\_zzz12324%\\_standardized\\_genetic\\_test](http://www.nature.com/ejhg_mattocks_zzz12324%_standardized_genetic_test)
- Mateo, H., Hernández, L. & Rivera, P. (2016). Pérdida recurrente del embarazo. Revisión bibliográfica. *Ginecol Obstet Mex*, 84 (8), 523-534. Recuperado de: <http://www.clinicadelafertilidaddebajacalifornia.com/uploads/prensa/files/2016-08-10%2010-0141.pdf>
- Palomo, I., Pereira, J., Alarcón, M., Pinochet, C., Vélez, C., Vélez, M., Hidalgo, P., Skagerberg, K. & Poblete, F. (2005). Factor V Leiden y mutación de la protrombina G20210A en pacientes con trombosis venosa y arterial. *Rev Méd Chile*, 133 (1), 1425-1433. Recuperado de: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872005001200003](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872005001200003)
- Papponetti, M. (2016). Trombosis venosa profunda y embolia pulmonar. *Intramed*. Recuperado de: <http://www.intramed.net/contenidoover.asp?contenidoID=89456>
- Rodrigo, J., Villa, R. & Veiras, O. (2010). Trombosis Venosa Profunda. *Fisterra*, 31(1), 1-5. Recuperado de: <http://www.fisterra.com/bd/upload/TVP.pdf>
- Roldan, V. (2010). *Características clínicas de los pacientes con trombofilia*. España. Recuperado de: <https://www.fesemi.org/sites/default/files/documentos/ponencias/vi-forum-etv/Dra.%20Vanesa%20Roldan.pdf>
- Rubio, B., Salazar, M. & Nava, A. (2012). Aspectos básicos sobre trombofilia, inflamación y autoinmunidad. *El Residente*, 7 (1),16-20. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/residente/rr-2012/rr121c.pdf>
- Ruisánchez, I., Trullols, E. & Ruiz, X. (2012). Validación de métodos analíticos cualitativos. España. Recuperado de: <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/qualit.pdf>
- Sánchez, A., Sandoval, A. & Armendáriz, J. (2013). *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. México. McGRAW-HILL.
- The Medical Biochemistry. (2017). *Introduction to Blood Coagulation*. Recuperado de: <https://themedicalbiochemistrypage.org/blood-coagulation.php>

- Tirado, M. (2004). *Análisis de la trombofilia hereditaria: Contribución de factores genéticos en la predisposición al tromboembolismo venoso en la población española*. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona. España. Recuperado de: [http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/36618/1/TESIS\\_ISABEL\\_TIRADO.pdf](http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/36618/1/TESIS_ISABEL_TIRADO.pdf)
- Uresandi, F., Iruin, G., Gómez, B., & Uresandi, A. (2008). Seguimiento de la tromboembolia pulmonar. *Med Clin*, 131 (2)54-59. Recuperado de: <http://appswl.elsevier.es/publicaciones/item/pdf?idApp=UINPBA00004N&pii=13130205&origen=zonadelectura&web=zonadelectura&urlApp=http://www.elsevier.es&estadoItem=S300&idiomaItem=es>
- Venegas, M., Conte, G. & Cuneo, M. (2006). Detección de las mutaciones Factor V Leiden y Protrombina G20210A en Pacientes con Trombosis Venosa. *Revista HCUCCh*, 17(1),141-147. Recuperado de: [https://www.redclinica.cl/Portals/0/Users/014/14/14/deteccion\\_mutationes\\_factor\\_V\\_leiden\\_y\\_protrombina.pdf](https://www.redclinica.cl/Portals/0/Users/014/14/14/deteccion_mutationes_factor_V_leiden_y_protrombina.pdf)
- Villa, R. & Veiras, O. (2009). Los principales problemas de salud: Trombosis venosa profunda. *AMF*, 5 (1), 11-20. Recuperado de: [http://amf-semfyc.com/upload\\_articles\\_pdf/Trombosis\\_venosa\\_profunda.pdf](http://amf-semfyc.com/upload_articles_pdf/Trombosis_venosa_profunda.pdf)
- Zabalegui, N. (2000). *Prevalencia del Factor V Leiden y la Mutacion G20210A del gen de la protrombina en Navarra y su papel como factores de riesgo trombotico*. Tesis doctoral. Universidad de Navarra. España. Recuperado de: [http://dadun.unav.edu/bitstream/10171/18791/1/TesisDoctoral\\_NataliaZabalegui\\_12-06-2000.pdf](http://dadun.unav.edu/bitstream/10171/18791/1/TesisDoctoral_NataliaZabalegui_12-06-2000.pdf)
- Zafra, M. (2011). *Desarrollo de un nuevo método para la detección de las mutaciones más frecuentes en los principales genes implicados en la trombofilia hereditaria*. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España. Recuperado de: <https://hera.ugr.es/tesisugr/19954438.pdf>

# ANEXOS

### Anexo No. 1: Localización del polimorfismo G1691A en el gen F5

El exón No. 10 del gen F5 (*Homo sapiens coagulation factor V [F5]*) es el presentado a continuación:

```
GGGGGTGGGG GCGGGGGGA GGGATAGCAT TAGGAGATAT ACCTAATGTT AATGACAAGT
TAATGGGTGC AGCACACCAA CATGACACAT GTATACATAT GTAACAAACC TGCACGTTGT
GCACATGTAC CCTAGAACTT AAAGTATAAT TTAAAAAATA TAAAAATAAA AGAATTCCTT
TTGCAATATT AATTGGTTCC AGCGAAAGCT TATTTATTTA TTTATTATCA TGAAATAACT
TTGCAAATGA AAACAATTTT GAATATATTT TCTTTCAGGC AGGAACAACA CCATGATCAG
AGCAGTTCAA CCAGGGGAAA CCTATACTTA TAAGTGGAAC ATCTTAGAGT TTGATGAACC
CACAGAAAAT GATGCCCAGT GCTTAACAAG ACCATACTAC AGTGACGTGG ACATCATGAG
AGACATCGCC TCTGGGCTAA TAGGACTACT TCTAATCTGT AAGAGCAGAT CCCTGGACAG
GCRAGCTTTA CAGGTATTTT GTCCTTGAAG TAACCTTCA GAAATTCTGA GAATTTCTTC
TGGCTAGAAC ATGTTAGGTC TCCTGGCTAA ATAATGGGGC ATTTCCCTTCA AGAGAACAGT
AATTGTCAAG TAGTCCTTTT TAGCACCAGT GTGATAACAT TTATTCTTTT TTTTTTTTTG
TCTTGTCTAT TTTTATCAGT ACCATCACTG CCGAAGAAGC AAGTCTAGAG TGTGATAACA
TATTTTGTCT TAGTTTCAA TTCCAGGTCT GTTGGTATTG GATGTGTTGA GCAAGTTGAT
TAGCCTTTCC TAATTTCTTC CTTTTATCAA ATGGGTAATA ACCCTCCTAA AAATGTTACA
GGTCTGTTT GGGGTTTCAAGT GAGATAACCAT CTGGTAAAAG TATAAAGCTC TTTACCAGTC
TTTGCTATTT TTAGAGACCT GCAATAGGGA GACAGAGGAG AGATTCTCTG AAAGCAACCA
AATTTAGAGA CATAGTTCCT AGTGAAATTG GACCCAGATT ATGGCCCATC TCTGTTGAGA
CTAAAGTATA CAGAAGAATG TGAACAAAGA TACTGAATTT CTGAGTTTGT CTTCATTGAA
GAATTGTAGT CTCATATTAT TAAACTAAAA TTCCAATTA TGCTAAACTG TAACCAAGAG
GTCTTATCTC AAGGCATACA AAATAAACAT ATGCCTAGAA AAAGCAGAAA T
```

Donde los nucleótidos en letra color rojo corresponden al amplicón de 241 bp obtenido mediante el uso de los primers subrayados en celeste (tanto el forward como el reverse) y subrayado en verde se observa la posición No. 1691 dentro del gen F5, en el cual puede encontrarse una guanina (en individuos sin FVL) o una adenina (en individuos con FVL), lo cual se representa con la letra R, según el código IUPAC.

*Anexo No. 2: Especificaciones de primers para amplificación del gen F5*

<b>CUADRO NO. 5: ESPECIFICACIONES DE PRIMERS PARA AMPLIFICACIÓN DEL GEN F5</b>		
	<b>FORWARD</b>	<b>REVERSE</b>
<b>Secuencia</b>	5'-TCA GGC AGG AAC AAC ACC AT-3'	5'- GGT TAC TTC AAG GAC AAA ATA CCT GTA AAG CT-3'
<b>Longitud</b>	23 bp	32 bp
<b>%GC</b>	50%	37.5%
<b>Temperatura de fusión</b>	58,4 °C	68,7 °C
<b>Tamaño del amplicon: 241 bp</b>		

*Anexo No. 3: Especificaciones de la enzima de restricción Hind III*

<b>CUADRO NO. 6: ESPECIFICACIONES DE LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN HIND III</b>	
Secuencia de reconocimiento	5' AAGCTT 3' 3' TTCGAA 5'
Tipo de extremos generados	Cohesivos
Productos del corte	5' A--AGCTT 3' 3' TTCGA--A 5'
Número de cortes que realiza	1
Cantidad de fragmentos generados	2

*Anexo No. 5: Concentraciones de ADN de las muestras de pacientes, controles positivos y no mutados.*

<b>CÓDIGO</b>	<b>CONCENTRACIÓN DE ADN (ng/μl)</b>	<b>ABSORBANCIA 260/280</b>
FVL-01	140.1	1.85
FVL-02	222.1	1.91
FVL-03	77.9	1.90
FVL-04	204.9	1.86
FVL-05	213.7	1.82
FVL-06	175.2	1.88
FVL-07	118.5	1.89
FVL-08	170.5	1.87
FVL-09	119.1	1.90
FVL-10	237.2	1.87
FVL-11	98.7	1.91
FVL-12	272.1	1.88
FVL-13	259.9	1.86
FVL-14	199.0	1.85
FVL-15	108.4	1.87
FVL-16	124.8	1.89
FVL-17	57.6	1.94
FVL-18	231.8	1.87
FVL-19	192.8	1.88
FVL-20	205.7	1.88
FVL-21	177.3	1.88

<b>CONTROLES POSITIVOS</b>			
<b>CÓDIGO</b>	<b>CONCENTRACIÓN DE ADN (ng/μl)</b>	<b>ABSORBANCIA 260/280</b>	<b>GENOTIPO</b>
H7123	24.6	1.80	Heterocigoto
H7199	22.3	1.83	Heterocigoto
H6295	21.6	1.92	Heterocigoto
N1048	21.7	1.89	Heterocigoto

<b>CONTROLES NO MUTADOS</b>			
<b>CÓDIGO</b>	<b>CONCENTRACIÓN DE ADN (ng/μl)</b>	<b>ABSORBANCIA 260/280</b>	<b>GENOTIPO</b>
X1405	124.1	1.89	Silvestre
X1905	129.6	1.86	Silvestre
X4905	125.2	1.92	Silvestre
X1149	128.3	1.85	Silvestre

*Anexo No. 6: Bitácora de PCR, digestión con Hind III y electroforesis en gel de agarosa.*

**Ensayo No. 1 para estandarización de PCR punto final para amplificación del gen que codifica para el factor V de coagulación (Semana del 31/07/2017).**

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA PCR</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 3 muestras (µl).</b>
Buffer Y 10x	5	15
Enhancer 5x	10	30
dNTPs	1	3
Primers (F)	1.5	4.5
Primers (R)	1.5	4.5
Taq Polimerasa	0.5	1.5
ADN	Equivalente a 300 ng/µl.	-
Agua grado reactivo	A completar volumen final de 50 µl.	-

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>			
	<b>CP H7199</b>	<b>CNM X1149</b>	<b>CN</b>
Agua grado reactivo	17.0	28.2	30.5
Master Mix	19.5	19.5	19.5
ADN	13.5	2.3	-
Volumen final	50	50	50.0

<b>PROGRAMA DE PCR</b>		
	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>
	95	10
40 ciclos	94	1
	55	1
	72	1
	72	5
	04	Indefinido

<b>CONDICIONES PARA EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Concentración	3% (4.5 g de agarosa en 150 mL de TBE 1x).
Cantidad de bromuro de etidio	4 µl
Voltaje	120 V
Tiempo de corrida	1 hora

<b>DISPENSADO DE VOLUMENES EN EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Pozo No. 1: Marcador de peso molecular.	3 µl de ladder y 1 µl de loading buffer 6x.
Pozo No. 2: CP H7199	8 µl de ADN amplificado y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 3: CP H7123	8 µl de ADN amplificado y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 4: CN	8 µl de CN y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.

**Ensayo No. 2 para estandarización de digestión de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica y electroforesis en gel de agarosa para la detección del FVL (Semana del 07/08/2017).**

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA PCR</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 3 muestras (µl).</b>
Buffer Y 10x	5	15
Enhancer 5x	10	30
dNTPs	1	3
Primers (F)	1.5	4.5
Primers (R)	1.5	4.5
Taq Polimerasa	0.5	1.5
ADN	Equivalente a 300 ng/µl.	-
Agua grado reactivo	A completar volumen final de 50 µl.	-

<b>DISPENSADO DE VOLUMENES PARA PCR</b>			
	<b>CP H7199</b>	<b>CNM X1405</b>	<b>CN</b>
Agua grado reactivo	17.0	28.1	30.5
Master Mix	19.5	19.5	19.5
ADN	13.5	2.4	-
Volumen final	50	50	50

No se modificó el programa de PCR.

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i></b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 3 muestras (µl).</b>
Buffer 10x	3	9
<i>Hind III</i>	1	3
ADN amplificado	26	-
Volumen final	30	-

<b>CONDICIONES DE DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i></b>		
Incubación	Tiempo	2 horas
	Temperatura	37 °C
Inactivación	Tiempo	20 minutos
	Temperatura	80 °C

<b>CONDICIONES PARA EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Concentración	3% (4.5 g de agarosa en 150 mL de TBE 1x).
Cantidad de bromuro de etidio	4 µl
Voltaje	120 V
Tiempo de corrida	1 hora

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES EN EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Pozo No. 1: Marcador de peso molecular	3 µl de ladder y 1 µl de loading buffer 6x.
Pozo No. 2: CP H7199	8 µl de ADN digerido y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 3: CNM X1405	8 µl de ADN digerido y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 4: CN	8 µl de CN y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.

**Ensayo No. 3 para estandarización de digestión de los Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica y electroforesis en gel de agarosa para la detección del FVL (Semana del 14/08/2017).**

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA PCR</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 7 muestras (µl).</b>
Buffer Y 10x	5	35
Enhancer 5x	10	70
dNTPs	1	7
Primers (F)	1.5	10.5
Primers (R)	1.5	10.5
Taq Polimerasa	0.5	3.5
ADN	Equivalente a 300 ng/µl.	-
Agua grado reactivo	A completar volumen final de 50 µl.	-

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>						
	<b>CP H7199</b>	<b>CP H7123</b>	<b>CNM X1405</b>	<b>CNM X1905</b>	<b>CNM X4905</b>	<b>CN</b>
Agua grado reactivo	17.0	18.3	28.1	28.2	28.1	30.5
Master Mix	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
ADN	13.5	12.2	2.4	2.3	2.4	-
Volumen final	50	50	50	50	50	50

No se modificó el programa de PCR.

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i></b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 7 muestras (µl).</b>
Buffer 10x	4.5	31.5
<i>Hind III</i>	0.5	3.5
ADN amplificado	25	-
Volumen final	30	-

<b>CONDICIONES DE DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i> PARA ALICUOTA NO. 1</b>		
Incubación	Tiempo	3 horas
	Temperatura	37 °C
Inactivación	Tiempo	20 minutos
	Temperatura	80 °C

<b>CONDICIONES DE DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i> PARA ALICUOTA NO. 2</b>		
Incubación	Tiempo	12 horas
	Temperatura	37 °C
Inactivación	Tiempo	20 minutos
	Temperatura	80 °C

<b>CONDICIONES PARA EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Concentración	3% (4.5 g de agarosa en 150 mL de TBE 1x).
Cantidad de bromuro de etidio	4 µl
Voltaje	120 V
Tiempo de corrida	1 hora y 20 minutos.

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES EN EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Pozo No. 1: Marcador de peso molecular	3 $\mu$ l de ladder y 1 $\mu$ l de loading buffer 6x.
Pozo No. 2: CP H7199	8 $\mu$ l de ADN digerido por 3 horas y 2 $\mu$ l de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 3: CP H7123	8 $\mu$ l de ADN digerido por 3 horas y 2 $\mu$ l de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 4: CNM X1405	8 $\mu$ l de ADN digerido por 3 horas y 2 $\mu$ l de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 5: CNM X1905	8 $\mu$ l de ADN digerido por 3 horas y 2 $\mu$ l de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 6: CNM X4905	8 $\mu$ l de ADN digerido por 3 horas y 2 $\mu$ l de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 7: CP H7199	8 $\mu$ l de ADN digerido por 12 horas y 2 $\mu$ l de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 8: CP H7123	8 $\mu$ l de ADN digerido por 12 horas y 2 $\mu$ l de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 9: CNM X1405	8 $\mu$ l de ADN digerido por 12 horas y 2 $\mu$ l de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 10: CNM X1905	8 $\mu$ l de ADN digerido por 12 horas y 2 $\mu$ l de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 11: CNM X4905	8 $\mu$ l de ADN digerido por 12 horas y 2 $\mu$ l de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 12: CN	8 $\mu$ l de CN y 2 $\mu$ l de loading buffer dye purple 6x.

**Ensayo No. 4 para estandarización de la electroforesis en gel de agarosa para la detección del FVL (Semana del 14/08/2017).**

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA PCR</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (<math>\mu</math>l).</b>	<b>Master Mix para 3 muestras (<math>\mu</math>l).</b>
Buffer Y 10x	5	15
Enhancer 5x	10	30
dNTPs	1	3
Primers (F)	1.5	4.5
Primers (R)	1.5	4.5
Taq Polimerasa	0.5	1.5
ADN	Equivalente a 300 ng/ $\mu$ l.	-
Agua grado reactivo	A completar volumen final de 50 $\mu$ l.	-

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>			
	<b>CNM X1405</b>	<b>CP H7199</b>	<b>CN</b>
Agua grado reactivo	28.1	17.0	30.5
Master Mix	19.5	19.5	19.5
ADN	2.4	13.5	-
Volumen final	50	50	50

No se modificó el programa de PCR.

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i></b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 3 muestras (µl).</b>
Buffer 10x	4.5	13.5
<i>Hind III</i>	0.5	1.5
ADN amplificado	25	-
Volumen final	30	-

<b>CONDICIONES DE DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i></b>		
Incubación	Tiempo	3 horas
	Temperatura	37 °C
Inactivación	Tiempo	20 minutos
	Temperatura	80 °C

<b>CONDICIONES PARA EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Concentración	3% (4.5 g de agarosa en 150 mL de TBE 1x).
Cantidad de bromuro de etidio	4 µl
Voltaje	120 V
Tiempo de corrida	1 hora y 40 minutos

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES EN EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Pozo No. 1: Marcador de peso molecular	3 µl de ladder y 1 µl de loading buffer 6x.
Pozo No. 2: CNM X1405	8 µl de ADN digerido y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 3: CP H7199	8 µl de ADN digerido y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 4: CN	8 µl de CN y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.

**Ensayo No. 5 para evaluación de especificidad (Semana del 21/08/2017).**

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA PCR</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 6 muestras (µl).</b>
Buffer Y 10x	5	30
Enhancer 5x	10	60
dNTPs	1	6
Primers (F)	1.5	9
Primers (R)	1.5	9
Taq Polimerasa	0.5	3
ADN	Equivalente a 300 ng/µl.	-
Agua grado reactivo	A completar volumen final de 50 µl.	-

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>					
	<b>CNM X1405</b>	<b>CNM X1905</b>	<b>CNM X4905</b>	<b>CNM X1149</b>	<b>CN</b>
Agua grado reactivo	28.1	28.2	28.1	28.2	30.5
Master Mix	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
ADN	2.4	2.3	2.4	2.3	-
Volumen final	50	50	50	50	50

No se modificó el programa de PCR.

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i></b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 6 muestras (µl).</b>
Buffer 10x	4.5	27
<i>Hind III</i>	0.5	3
ADN amplificado	25	-
Volumen final	30	-

No se modificaron las condiciones de digestión con *Hind III* y de la electroforesis.

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES EN EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Pozo No. 1: Marcador de peso molecular	3 µl de ladder y 1 µl de loading buffer 6x.
Pozo No. 2: CNM X1405	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 3: CNM X1905	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 4: CNM X4905	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 5: CNM X1149	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 6: CN	8 µl de CN y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.

**Ensayo No. 6 para evaluación sensibilidad (Semana del 21/08/2017).**

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA PCR</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 6 muestras (µl).</b>
Buffer Y 10x	5	30
Enhancer 5x	10	60
dNTPs	1	6
Primers (F)	1.5	9
Primers (R)	1.5	9
Taq Polimerasa	0.5	3
ADN	Equivalente a 300 ng/µl.	-
Agua grado reactivo	A completar volumen final de 50 µl.	-

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>					
	<b>CP H7123</b>	<b>CP H7199</b>	<b>CP H6295</b>	<b>CP N1048</b>	<b>CN</b>
Agua grado reactivo	18.3	17.0	16.6	16.7	30.5
Master Mix	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
ADN	12.2	13.5	13.9	13.8	-
Volumen final	50	50	50	50	50

No se modificó el programa de PCR.

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i></b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 7 muestras (µl).</b>
Buffer 10x	4.5	27
<i>Hind III</i>	0.5	3
ADN amplificado	25	-
Volumen final	30	-

No se modificaron las condiciones de digestión con *Hind III* y de la electroforesis.

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES EN EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Pozo No. 1: Marcador de peso molecular	3 µl de ladder y 1 µl de loading buffer 6x.
Pozo No. 2: CP H7123	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 3: CP H7199	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 4: CP H6295	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 5: CP N1048	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 6: CN	8 µl de CN y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.

**Ensayo No. 7 para evaluación del límite de detección (Semana del 21/08/2017).**

Se realizaron diluciones seriadas dobles del Control Positivo H7123 a las siguientes concentraciones:

<b>DILUCIÓN</b>	<b>CONCENTRACIÓN DE ADN (ng/µl)</b>
1:1	300
1:2	150
1:4	75
1:8	37.50
1:16	18.75
1:32	9.38
1:64	4.69
1:128	2.34
1:256	1.17
1:512	0.59

Posteriormente, dichas diluciones se procesaron según técnica estandarizada.

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA PCR</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 12 muestras (µl).</b>
Buffer Y 10x	5	60
Enhancer 5x	10	120
dNTPs	1	12
Primers (F)	1.5	18.0
Primers (R)	1.5	18.0
Taq Polimerasa	0.5	6.0
ADN	3.0	-
Agua grado reactivo	A completar volumen final de 50 µl.	-

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>					
	<b>CP H7123 (200 ng/µl)</b>	<b>CP H7123 (100 ng/µl)</b>	<b>CP H7123 (50 ng/µl)</b>	<b>CP H7123 (25 ng/µl)</b>	<b>CP H7123 (12.5 ng/µl)</b>
Agua grado reactivo	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5
Master Mix	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
ADN	3	3	3	3	3
Volumen final	50	50	50	50	50

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>						
	<b>CP H7123 (6.25 ng/µl)</b>	<b>CP H7123 (3.12 ng/µl)</b>	<b>CP H7123 (1.56 ng/µl)</b>	<b>CP H7123 (0.78 ng/µl)</b>	<b>CP H7123 (0.59 ng/µl)</b>	<b>CN</b>
Agua grado reactivo	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5	30.5
Master Mix	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
ADN	3	3	3	3	3	-
Volumen final	50	50	50	50	50	50

No se modificó el programa de PCR.

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i></b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 12 muestras (µl).</b>
Buffer 10x	4.5	54.0
<i>Hind III</i>	0.5	6.0
ADN amplificado	25	-
Volumen final	30	-

No se modificaron las condiciones de digestión con *Hind III* y de la electroforesis.

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES EN EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Pozo No. 1: Marcador de peso molecular	3 µl de ladder y 1 µl de loading buffer 6x.
Pozo No. 2: CP H7123 (200 ng/µl)	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 3: CP H7123 (100 ng/µl)	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 4: CP H7123 (50 ng/µl)	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 5: CP H7123 (25 ng/µl)	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 6: CP H7123 (12.5 ng/µl)	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 7: CP H7123 (6.25 ng/µl)	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 8: CP H7123 (3.12 ng/µl)	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 9: CP H7123 (1.56 ng/µl)	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 10: CP H7123 (0.78 ng/µl)	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 11: CP H7123 (0.59 ng/µl)	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 12: CN	8 µl de CN y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.

**Ensayo No. 8 para evaluación de repetibilidad (Semana del 28/08/2017).**

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA PCR</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 12 muestras (µl).</b>
Buffer Y 10x	5	60
Enhancer 5x	10	120
dNTPs	1	12
Primers (F)	1.5	18.0
Primers (R)	1.5	18.0
Taq Polimerasa	0.5	6.0
ADN	Equivalente a 300 ng/µl.	-
Agua grado reactivo	A completar volumen final de 50 µl.	-

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>					
	<b>CP N1048</b>				
Agua grado reactivo	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7
Master Mix	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
ADN	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8
Volumen final	50	50	50	50	50

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>						
	<b>CNM X1905</b>	<b>CN</b>				
Agua grado reactivo	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	30.5
Master Mix	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
ADN	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	-
Volumen final	50	50	50	50	50	50

No se modificó el programa de PCR.

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i></b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 12 muestras (µl).</b>
Buffer 10x	4.5	54.0
<i>Hind III</i>	0.5	6.0
ADN amplificado	25	-
Volumen final	30	-

No se modificaron las condiciones de digestión con *Hind III* y de la electroforesis.

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES EN EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Pozo No. 1: Marcador de peso molecular	3 µl de ladder y 1 µl de loading buffer 6x.
Pozo No. 2: CP N1048	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 3: CP N1048	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 4: CP N1048	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 5: CP N1048	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 6: CP N1048	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 7: CNM X1905	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 8: CNM X1905	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 9: CNM X1905	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de Loading Buffer Dye, purple 6x.
Pozo No. 10: CNM X1905	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 11: CNM X1905	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 12: CN	8 µl de CN y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.

**Ensayo No. 9 para evaluación de reproducibilidad (Semana del 28/08/2017).**

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA PCR</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 3 muestras (µl).</b>
Buffer Y 10x	5	15
Enhancer 5x	10	30
dNTPs	1	3
Primers (F)	1.5	4.5
Primers (R)	1.5	4.5
Taq Polimerasa	0.5	1.5
ADN	Equivalente a 300 ng/µl.	-
Agua grado reactivo	A completar volumen final de 50 µl.	-

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>			
	<b>CNM X1405</b>	<b>CP H7199</b>	<b>CN</b>
Agua grado reactivo	28.1	17.0	30.5
Master Mix	19.5	19.5	19.5
ADN	2.4	13.5	-
Volumen final	50	50	50

No se modificó el programa de PCR.

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i></b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 3 muestras (µl).</b>
Buffer 10x	4.5	13.5
<i>Hind III</i>	0.5	1.5
ADN amplificado	25	-
Volumen final	30	-

No se modificaron las condiciones de digestión con *Hind III* y de la electroforesis.

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES EN EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Pozo No. 1: Marcador de peso molecular	3 µl de ladder y 1 µl de loading buffer 6x.
Pozo No. 2: CNM X1405	8 µl de ADN digerido y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 3: CP H7199	8 µl de ADN digerido y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 4: CN	8 µl de CN y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.

**Ensayo No. 10 para la detección del Factor V Leiden en pacientes con trombosis venosa mediante la técnica molecular estandarizada.**

Para la realización de este ensayo fue requerido un paso inicial de extracción de ADN, el cual fue realizado según especificaciones del protocolo de trabajo estandarizado por el Laboratorio de Biología Molecular “Elmer Cisneros” *in memoriam*, y que por tanto no fue motivo de discusión en este trabajo monográfico, sin embargo es necesario mencionar que la totalidad de las muestras de pacientes procesados cumplían con el índice de absorbancia 260/280 entre 1.8 y 2.0 DO, así como concentraciones de ADN entre 50-300 ng/µl (ver Anexo No. 4), garantizando así un material genético con un óptimo grado de pureza.

**-Primera corrida de pacientes (Semana del 28/08/2017).**

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA PCR</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 7 muestras (µl).</b>
Buffer Y 10x	5	35
Enhancer 5x	10	70
dNTPs	1	7
Primers (F)	1.5	10.5
Primers (R)	1.5	10.5
Taq Polimerasa	0.5	3.5
ADN	Equivalente a 300 ng/µl.	-
Agua grado reactivo	A completar volumen final de 50 µl.	-

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>						
	<b>Px FVL-01</b>	<b>Px FVL-02</b>	<b>Px FVL-03</b>	<b>CNM X1405</b>	<b>CP H7199</b>	<b>CN</b>
Agua grado reactivo	28.4	29.1	26.6	28.1	17.0	30.5
Master Mix	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
ADN	2.1	1.4	3.9	2.4	13.5	-
Volumen final	50	50	50	50	50	50

No se modificó el programa de PCR.

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i></b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 7 muestras (µl).</b>
Buffer 10x	4.5	31.5
<i>Hind III</i>	0.5	3.5
ADN amplificado	25	-
Volumen final	30	-

No se modificaron las condiciones de digestión con *Hind III* y de la electroforesis.

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES EN EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Pozo No. 1: Marcador de peso molecular	3 µl de ladder y 1 µl de loading buffer 6x.
Pozo No. 2: Px FVL-01	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 3: Px FVL-02	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 4: Px FVL-03	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 5: CNM X1405	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 6: CP H7199	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 7: CN	8 µl de CN y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.

**-Segunda corrida de pacientes (Semana del 04/09/2017).**

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA PCR</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 12 muestras (µl).</b>
Buffer Y 10x	5	60
Enhancer 5x	10	120
dNTPs	1	12
Primers (F)	1.5	18.0
Primers (R)	1.5	18.0
Taq Polimerasa	0.5	6.0
ADN	Equivalente a 300 ng/µl.	-
Agua grado reactivo	A completar volumen final de 50 µl.	-

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>					
	<b>Px FVL-04</b>	<b>Px FVL-05</b>	<b>Px FVL-06</b>	<b>Px FVL-07</b>	<b>Px FVL-08</b>
Agua grado reactivo	29.0	29.1	28.8	28.0	28.7
Master Mix	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
ADN	1.5	1.4	1.7	2.5	1.8
Volumen final	50	50	50	50	50

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>					
	<b>Px FVL-09</b>	<b>Px FVL-10</b>	<b>CNM X1405</b>	<b>CP H7199</b>	<b>CN</b>
Agua grado reactivo	28.0	29.2	28.1	17.0	30.5
Master Mix	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
ADN	2.5	1.3	2.4	13.5	-
Volumen final	50	50	50	50	50

No se modificó el programa de PCR.

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i></b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 12 muestras (µl).</b>
Buffer 10x	4.5	54.0
<i>Hind III</i>	0.5	6.0
ADN amplificado	25	-
Volumen final	30	-

No se modificaron las condiciones de digestión con *Hind III* y de la electroforesis.

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES EN EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Pozo No. 1: Marcador de peso molecular	3 µl de ladder y 1 µl de loading buffer 6x.
Pozo No. 2: Px FVL-04	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 3: Px FVL-05	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 4: Px FVL-06	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 5: Px FVL-07	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 6: Px FVL-08	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 7: Px FVL-09	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 8: Px FVL-10	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 9: CNM X1405	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de Loading Buffer Dye, purple 6x.
Pozo No. 10: CP H7199	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 11: CN	8 µl de CN y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.

-Tercera corrida de pacientes (Semana del 11/09/2017).

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA PCR</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 8 muestras (µl).</b>
Buffer Y 10x	5	40
Enhancer 5x	10	80
dNTPs	1	8
Primers (F)	1.5	12
Primers (R)	1.5	12
Taq Polimerasa	0.5	4
ADN	Equivalente a 300 ng/µl.	-
Agua grado reactivo	A completar volumen final de 50 µl.	-

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>							
	<b>Px FVL-11</b>	<b>Px FVL-12</b>	<b>Px FVL-13</b>	<b>Px FVL-14</b>	<b>CNM X1405</b>	<b>CP H7199</b>	<b>CN</b>
Agua grado reactivo	27.5	29.4	29.3	29.0	28.1	17.0	30.5
Master Mix	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
ADN	3.0	1.1	1.2	1.5	2.4	13.5	-
Volumen final	50	50	50	50	50	50	50

No se modificó el programa de PCR.

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i></b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 8 muestras (µl).</b>
Buffer 10x	4.5	36
<i>Hind III</i>	0.5	4
ADN amplificado	25	-
Volumen final	30	-

No se modificaron las condiciones de digestión con *Hind III* y de la electroforesis.

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES EN EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Pozo No. 1: Marcador de peso molecular	3 µl de ladder y 1 µl de loading buffer 6x.
Pozo No. 2: Px FVL-11	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 3: Px FVL-12	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 4: Px FVL-13	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 5: Px FVL-14	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 6: CNM X1405	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 7: CP H7199	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 8: CN	8 µl de CN y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.

**-Cuarta corrida de pacientes (Semana del 18/09/2017).**

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA PCR</b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 12 muestras (µl).</b>
Buffer Y 10x	5	60
Enhancer 5x	10	120
dNTPs	1	12
Primers (F)	1.5	18.0
Primers (R)	1.5	18.0
Taq Polimerasa	0.5	6.0
ADN	Equivalente a 300 ng/µl.	-
Agua grado reactivo	A completar volumen final de 50 µl.	-

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>					
	<b>Px FVL-15</b>	<b>Px FVL-16</b>	<b>Px FVL-17</b>	<b>Px FVL-18</b>	<b>Px FVL-19</b>
Agua grado reactivo	27.7	28.1	25.3	29.2	28.9
Master Mix	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
ADN	2.8	2.4	5.2	1.3	1.6
Volumen final	50	50	50	50	50

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES PARA PCR</b>					
	<b>Px FVL-20</b>	<b>Px FVL-21</b>	<b>CNM X1405</b>	<b>CP H7123</b>	<b>CN</b>
Agua grado reactivo	29.0	28.8	28.1	18.3	30.5
Master Mix	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
ADN	1.5	1.7	2.4	12.2	-
Volumen final	50	50	50	50	50

No se modificó el programa de PCR.

<b>PREPARACIÓN DE MASTER MIX PARA DIGESTIÓN CON <i>HIND III</i></b>		
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen por muestra (µl).</b>	<b>Master Mix para 12 muestras (µl).</b>
Buffer 10x	4.5	54.0
<i>Hind III</i>	0.5	6.0
ADN amplificado	25	-
Volumen final	30	-

No se modificaron las condiciones de digestión con *Hind III* y de la electroforesis.

<b>DISPENSADO DE VOLÚMENES EN EL GEL DE ELECTROFORESIS</b>	
Pozo No. 1: Marcador de peso molecular	3 µl de ladder y 1 µl de loading buffer 6x.
Pozo No. 2: Px FVL-15	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 3: Px FVL-16	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 4: Px FVL-17	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 5: Px FVL-18	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 6: Px FVL-19	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 7: Px FVL-20	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 8: Px FVL-21	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 9: CNM X1405	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 10: CP H7123	8 µl de ADN digerido por 12 horas y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.
Pozo No. 11: CN	8 µl de CN y 2 µl de loading buffer dye purple 6x.

*Anexo No. 7: Tablas de datos*

<b>TABLA NO. 1</b>			
	<b>CONTROL NO MUTADO</b>	<b>CONTROL POSITIVO</b>	<b>TOTAL</b>
<b>NEGATIVO</b>	4	0	4
<b>POSITIVO</b>	0	4	4
<b>TOTAL</b>	4	4	8

**Tabla No.1: Tabla de contingencia. Evaluación de sensibilidad, especificidad, eficacia diagnóstica, falsos positivos y falsos negativos. Fuente:** Bitácora de PCR, digestión con *Hind III* y electroforesis en gel de agarosa.

**Nota:** En las columnas se ubican los resultados obtenidos por el laboratorio de referencia y en las filas los resultados obtenidos por la técnica en estandarización.

<b>TABLA NO. 2</b>		
<b>CÓDIGO DE CONTROLES</b>	<b>NÚMERO DE CONTROLES REPETIBLES</b>	<b>NÚMERO DE CONTROLES NO REPETIBLES</b>
CP N1048	5	0
CNM X1905	5	0

**Tabla No. 2: Evaluación de repetibilidad. Fuente:** Bitácora de PCR, digestión con *Hind III* y electroforesis en gel de agarosa.

<b>TABLA NO. 3</b>		
<b>CÓDIGO DE CONTROLES</b>	<b>NÚMERO DE CONTROLES REPRODUCIBLES</b>	<b>NÚMERO DE CONTROLES NO REPRODUCIBLES</b>
CP N1048	5	0
CNM X1905	5	0

**Tabla No. 3: Evaluación de reproducibilidad. Fuente:** Bitácora de PCR, digestión con *Hind III* y electroforesis en gel de agarosa.

<b>TABLA NO. 4</b>		
<b>CÓDIGO</b>	<b>GENOTIPO ENCONTRADO</b>	<b>RESULTADO DE LA DETECCIÓN DEL FVL</b>
FVL-01	Silvestre	Negativo
FVL-02	Silvestre	Negativo
FVL-03	Silvestre	Negativo
FVL-04	Silvestre	Negativo
FVL-05	Silvestre	Negativo
FVL-06	Silvestre	Negativo
FVL-07	Silvestre	Negativo
FVL-08	Silvestre	Negativo
FVL-09	Silvestre	Negativo
FVL-10	Silvestre	Negativo
FVL-11	Silvestre	Negativo
FVL-12	Silvestre	Negativo
FVL-13	Silvestre	Negativo
FVL-14	Silvestre	Negativo
FVL-15	Heterocigoto	Positivo
FVL-16	Silvestre	Negativo
FVL-17	Heterocigoto	Positivo
FVL-18	Silvestre	Negativo
FVL-19	Silvestre	Negativo
FVL-20	Silvestre	Negativo
FVL-21	Heterocigoto	Positivo

*Tabla No. 4: Resultados obtenidos mediante la detección del FVL en pacientes con Trombosis Venosa Profunda de origen idiopática atendidos en el Hospital Escuela “Roberto Calderón” durante el periodo comprendido entre julio a septiembre de 2017. Fuente: Bitácora de PCR, digestión con Hind III y electroforesis en gel de agarosa.*

Anexo No. 8: Hoja de recolección de datos

 <p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA UNAN - MANAGUA</p>	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA UNAN-MANAGUA INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO</p>	
--	--	---

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

**DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS**

<b>Nombre completo</b>		<b>Código asignado</b>	
<b>Dirección de domicilio</b>		<b>Fecha</b>	
<b>Hospital de referencia</b>		<b>Teléfono de contacto</b>	
		<b>No. de Expediente</b>	
<b>Sexo</b>	F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>	<b>Edad</b>	
<b>Lugar de origen</b>			

**ANTECEDENTES FAMILIARES**

<p>¿Existen en su familia individuos a los que se les haya diagnosticado con trombosis?</p>	<p>Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> ¿? <input type="checkbox"/></p> <p>Grado de consanguinidad: _____</p>	<p>¿Cuántos?</p>
<p>¿Qué tipo de trombosis?</p>		
<p>¿Existen en su familia individuos que espontáneamente presenten sangrado sin causa aparente?</p>	<p>Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p>	<p>Mucosas <input type="checkbox"/></p> <p>Piel <input type="checkbox"/></p> <p>Gastrointestinal</p> <p>Otro _____</p>
<p><b>Otros datos de interés</b></p>		

## HISTORIAL DEL PACIENTE

Factores de riesgo	Enfermedad de base
Uso de anticonceptivos orales <input type="checkbox"/>	Neoplasia <input type="checkbox"/> Tipo _____
Inmovilización (>48 horas en el último mes) <input type="checkbox"/>	Enfermedad autoinmune <input type="checkbox"/>
Tratamiento hormonal <input type="checkbox"/>	Síndrome mielodisplásico <input type="checkbox"/>
Post- Cirugía <input type="checkbox"/>	Otro _____
Obesidad <input type="checkbox"/>	
Traumatismo <input type="checkbox"/>	
Hipertensión arterial <input type="checkbox"/>	
Puerperio <input type="checkbox"/>	
Dislipemia <input type="checkbox"/>	
Diabetes <input type="checkbox"/>	
Venas varices <input type="checkbox"/>	
Origen idiopático <input type="checkbox"/>	

## RECURRENCIA DE EVENTOS TROMBÓTICOS

No. de eventos trombóticos	Edad	Localización de la trombosis	Factores de riesgo asociados	Aparición de EP

*En caso de que el paciente en estudio sea del sexo femenino, completar la siguiente información:*

Número de gestaciones			
Número de partos	¿Ha requerido de transfusión de hemocomponentes durante el parto o postparto?	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
Número de pérdidas gestacionales			



## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

### UNAN-MANAGUA

### INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD

#### Departamento de Bioanálisis Clínico

#### Laboratorio de Biología Molecular MA. “Elmer Cisneros” *in memoriam*.

### HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estandarización de la técnica molecular PCR-RFLP para la detección del Factor V Leiden (polimorfismo G1691A) en pacientes con trombosis venosa atendidos en el Hospital Escuela “Roberto Calderón”, Managua, julio-septiembre de 2017.

Investigadores:

- *Luvy Montealegre Roberts.*
- *William Ruiz Rodríguez.*

En colaboración con *Alexander Estrada.*

#### ***I. Descripción del estudio.***

El conocimiento sobre alteraciones genéticas desencadenantes de trombofilias ha aumentado de manera considerable durante los últimos años debido principalmente a que, su incidencia, morbilidad y complicaciones convierten a la enfermedad tromboembólica en un problema clínico importante. Desde el punto de vista patogénico, esta es una enfermedad multifactorial, por lo que el reto actual es generar una lista de posibles factores genéticos implicados y el estudio de su mecanismo fisiopatológico para poder analizar cómo contribuyen en esta enfermedad.



Hasta hoy se han identificado varios factores genéticos que predisponen a la trombosis, entre estos se encuentra el Factor V Leiden (FVL). Debido a que esta condición clínica es causada por una mutación en el material genético (ADN), el análisis molecular es considerado un pilar diagnóstico. A pesar de esto, en Nicaragua, el diagnóstico de las trombofilias no se lleva a cabo a nivel molecular.

## ***II. ¿Qué requerimos de usted?***

Una muestra de sangre periférica, obtenida por punción venosa, la cual será almacenada en condiciones adecuadas hasta su procesamiento en el Laboratorio de Biología Molecular MA. “Elmer Cisneros” *in memoriam* para la detección del FVL mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa – Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (PCR-RFLP).

## ***III. ¿En qué le beneficiará esto a usted?***

La detección del FVL proporcionaría datos para el manejo terapéutico de la población en estudio ya que en individuos con la mutación se podría prescribir anticoagulantes como tratamiento preventivo con el propósito de evitar la aparición de nuevos eventos trombóticos, además de prevenir el desarrollo de los mismos en aquellos sin historial de la condición clínica asociada a la mutación, pero que resulten portadores del FVL con la técnica de PCR-RFLP, esto durante el cribado familiar de individuos sintomáticos.

## ***IV. Consideraciones éticas de la investigación***

Antes de dar su consentimiento para participar en este estudio, usted deberá haber hablado con alguno de los investigadores y ellos deberán contestar satisfactoriamente sus inquietudes al respecto.

Tome en consideración los siguientes aspectos:

- Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Si acepta, usted tiene el derecho de retirarse del estudio en cualquier momento.
- No recibirá ningún tipo de remuneración económica por participar en esta investigación.



- La información brindada por usted y los resultados obtenidos con el procesamiento de su muestra sanguínea serán resguardados de forma confidencial, sin embargo, podría ser divulgada, por ejemplo, en publicaciones científicas, pero en todos los casos, de manera anónima y solamente con fines académicos.
- Se le mantendrá informado de cualquier variación en el curso de investigación que pudiese afectarle.
- La muestra sanguínea puede ser usada para otros estudios en el futuro.
- Una vez analizado su material genético se le proporcionará el resultado obtenido mediante la técnica estandarizada.

Si desea más información, comuníquese con el Dr. Allan Pernudi, director del laboratorio en donde se realiza la investigación, para ello puede llamar al número telefónico 89620874.

#### V. *Consentimiento*

Yo \_\_\_\_\_, mayor de edad, en pleno uso de mis facultades mentales acepto participar en el estudio *Estandarización de la técnica molecular PCR-RFLP para la detección del Factor V Leiden (polimorfismo G1691A) en pacientes con trombosis venosa atendidos en el Hospital Escuela "Roberto Calderón", Managua, julio-septiembre de 2017.*

Manifiesto haber aclarado todas mis dudas con alguno de los investigadores del estudio y me considero convenientemente informado.

Por tanto, doy mi consentimiento para la extracción de muestra de sangre para su posterior procesamiento y detección del Factor V Leiden.

---

Firma de participante

---

Firma del investigador



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA**

**UNAN-MANAGUA**

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD**

**Laboratorio de Biología Molecular MA. “Elmer Cisneros” in memoriam.**

**REPORTE DE ANÁLISIS MOLECULAR**

		<b>FECHA</b>	
<b>NOMBRE</b>			
<b>CÓDIGO</b>		<b>EDAD</b>	
<b>HOSPITAL</b>		<b>EXPEDIENTE</b>	
<b>PRUEBA SOLICITADA</b>		<b>RESULTADO</b>	
<b>OBSERVACIONES</b>			

---

Dr. Allan Pernudi  
Código MINSa 18541

*Anexo No. 11: Presupuesto*

<b>PRESUPUESTO</b>			
	<b>PRECIO UNITARIO</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>PRECIO TOTAL</b>
Primers	\$ 039	1	\$ 039
Enzima <i>Hind III</i>	\$ 134	1	\$ 134
Enzima Taq Polimerasa	\$ 206	1	\$ 206
		<b>TOTAL</b>	<b>\$ 379</b>

**Nota:** los materiales de reposición (guantes, puntas para pipetas, etc.) a utilizar en esta investigación fueron facilitados por el Laboratorio de Biología Molecular “Elmer Cisneros” *in memoriam*.

