

336427



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MEXICO

CAMPUS CHAPULTEPEC

ESCUELA DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
INCORPORADO A UNAM

**DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE
LA MUTACION. G20210A DEL GEN DE LA
PROTOMBINA EN UNA MUESTRA DE LA
POBLACION MEXICANA NORMAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA
HERANDY MARTHA GONZALEZ MEJIA

DIRECTOR DE TESIS
Q.F.B. JAVIER ARAIZA SANTIBAÑEZ

MEXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: QFB. Javier Araiza Santibáñez

Vocal: M. en C. Angélica Calderón Villagómez

Secretario: Q.F.B. Gerardo García Camacho

Primer Suplente: Q.F.B. Javier Carballo Perea

Segundo Suplente: M. en C. Víctor Manuel Sánchez Hidalgo

ASESOR

Q.F.B. JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ

SUSTENTANTE

HERANDY MARTHA GONZALEZ MEJIA

INDICE DE CONTENIDO

<i>Tema</i>	<i>Página</i>
INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS	i
INDICE DE TABLAS	ii
GLOSARIO	iii
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
1. MARCO TEORICO	1
1.1. <i>Antecedentes.</i>	1
1.2. <i>Hemostasia.</i>	2
1.2.1. Cascada de coagulación.	5
1.2.1.1. Vía extrínseca de la coagulación.	6
1.2.1.2. Vía intrínseca de la coagulación.	7
1.2.2. Propiedades estructurales de los componentes del sistema de activación de la Protrombina.	9
1.2.3. Mecanismos de activación de la Protrombina.	12
1.3. <i>Protrombina.</i>	13
1.3.1. Características bioquímicas de la Protrombina.	13
1.3.2. Biosíntesis de la Protrombina.	15
1.3.3. Estructuras funcionales de la Protrombina.	18
1.3.3.1. Fragmento 1 de la Protrombina.	19
1.3.3.2. Fragmento 2 de la Protrombina.	20
1.3.3.3. Pretrombina 2 y Trombina.	20
1.3.3.4. Meizotrombina.	22
1.4. <i>Gen de la Protrombina.</i>	22
1.4.1. Intrones del gen de la Protrombina.	25
1.4.2. Dominios que codifican los exones del gen de la Protrombina.	26
1.4.3. Secuencias <i>Alu</i> en el gen de la Protrombina.	28
1.5. <i>Fisiopatología de la Protrombina.</i>	29
1.6. <i>Mutación G20210A.</i>	30
1.6.1. Trombofilias hereditarias y mutación G20210A.	30

2. OBJETIVOS	38
2.1. <i>Objetivo General.</i>	38
2.2. <i>Objetivos Particulares.</i>	38
3. HIPÓTESIS	39
4. MATERIAL Y METODOS	40
4.1. <i>Material.</i>	40
4.1.1. Químico.	40
4.1.2. Biológico.	40
4.1.2.1. Criterios de inclusión y exclusión.	40
4.1.3. Equipo.	40
4.2. <i>Métodos.</i>	41
4.2.1. Obtención de la muestra.	41
4.2.2. Extracción de DNA.	41
4.2.3. Cuantificación de DNA.	44
4.2.4. Amplificación de DNA mediante PCR.	45
4.2.5. Digestión de DNA.	48
4.2.6. Electroforesis en gel de agarosa.	49
4.2.7. Análisis de genotipos.	50
5. RESULTADOS	51
5.1. <i>Distribución de la muestra obtenida.</i>	51
5.2. <i>Análisis de genotipos.</i>	52
5.3. <i>Frecuencia de la mutación G20210A en población mexicana.</i>	53
6. DISCUSIÓN	55
6.1. <i>Comparación con otros estudios.</i>	55
7. CONCLUSIONES	59
8. BIBLIOGRAFÍA	60

ANEXO 1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

Figura	Página
1. Vía extrínseca para iniciar la coagulación de la sangre.	7
2. Vía intrínseca para iniciar la coagulación de la sangre.	9
3. Vías de activación de la Protrombina.	13
4. Estructura de la molécula de Protrombina.	15
5. Secuencia prepro guía de la Protrombina Humana.	16
6. Gama carboxilación del ácido glutámico dependiente de la vitamina K.	17
7. Estructuras funcionales derivadas de la Protrombina.	18
8. Dominios componentes de la Protrombina.	20
9. Localización del gen de la Protrombina en el cromosoma 11.	23
10. Relación entre la estructura genética y la estructura proteínica de la Protrombina.	27
11. Localización de la mutación G20210A en el gen de la Protrombina.	34
12. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	46
13. Digestión por la enzima TaqI.	48
14. Alelo G20210A.	50
15. Electroforesis en gel de agarosa al 4%.	53

Gráfica	Página
1. Gráfica de poblaciones.	52

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Bioquímica de la Protrombina.	14
2. Sitios de Escisión de la Trombina sobre la Molécula de Protrombina.	22
3. Localización y Dimensión de Intrones en el Gen de la Protrombina Humana.	24
4. Localización y Dimensión de Exones en el Gen de la Protrombina Humana.	24
5. Secuencias en los Puntos de Empalme Intron/Exon del Gen de la Protrombina Humana.	25
6. Variantes de la Protrombina Humana.	30
7. Alteraciones Trombofílicas Hereditarias.	33
8. Prevalencia de Factores de Riesgo Hereditarios para Trombosis.	33
9. Frecuencias de la mutación G20210A reportadas.	37
10. Distribución de sexos en la muestra.	51
11. Distribución de edades en la muestra.	51
12. Frecuencias genotípicas del alelo G20210A en la muestra.	54

GLOSARIO

Alelo dominante es el que determina el fenotipo que muestra un heterocigoto con otro alelo (recesivo).

Alelo es una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un *locus* dado en un cromosoma.

Amplificación se refiere a la producción de copias adicionales de una secuencia cromosómica.

Anfipáticas son las estructuras que tienen dos superficies, una hidrofílica y otra hidrofóbica.

Aparato de Golgi es un sistema que consta de apilamientos individuales de membranas próximas al retículo endoplásmico; participa en la glicosilación de proteínas y su ordenamiento para el transporte a diferentes localizaciones celulares.

Bicapa lipídica es la forma adoptada por la concentración de lípidos en que los ácidos grasos hidrofóbicos ocupan el interior y las cabezas polares se dirigen hacia el exterior.

Caja CAAT es parte de una secuencia conservada localizada corriente arriba de los puntos de comienzo de la transcripción eucariótica. Es un sitio de reconocimiento importante para el inicio de la transcripción.

Caja TATA es un septámero conservado rico en A•T que se encuentra unos 25 pb antes del punto de comienzo de la transcripción por la RNA polimerasa II eucariótica; puede participar en colocar la enzima para una iniciación correcta.

Cap o tapa es la estructura situada en el extremo 5' del mRNA eucariótico, introducida después de la transcripción uniendo el fosfato terminal del 5'GTP a la base terminal del mRNA. Las G añadidas (y a veces otras bases) se metilan, dando lugar a una estructura $7\text{MeG}^5\text{ppp}^5\text{Np}\dots$

cdNA es un DNA de cadena sencilla complementario de un mRNA, sintetizado a partir de él por transcripción inversa *in vitro*.

Centrómero es una región constreñida de un cromosoma que comprende el punto de sujeción del huso mitótico o meiótico.

Clon describe un gran número de células o de moléculas idénticas a una molécula o célula ancestral única.

Codificar es transformar, mediante un código contenido en el DNA, la formulación de un mensaje o mRNA.

Codón de terminación es una de las tres secuencias de tripletes, UAG, UAA o UGA, que dan lugar a la terminación de la síntesis proteínica; se llaman también codones "sin sentido".

Codón es un triplete de nucleótidos que representa un aminoácido o una señal de terminación.

Corriente abajo o aguas abajo (downstream) identifica secuencias que van más allá en la dirección de expresión; por ejemplo, la región codificadora está corriente abajo del codón de iniciación.

Corriente arriba o aguas arriba (upstream) identifica secuencias que se mueven en la dirección opuesta de la expresión.

Cromosoma es una unidad discreta del genoma que transporta muchos genes. Cada cromosoma consiste en una molécula muy larga de DNA dúplex y una masa aproximadamente igual de proteínas. Sólo es visible como entidad morfológica durante la división celular.

Cromosomas homólogos son cromosomas que transportan los mismos *loci* genéticos; una célula diploide tiene dos copias de cada homólogo, una derivada de cada progenitor.

Desnaturalización del DNA describe su conversión desde la cadena doble al estado de cadena sencilla; la separación de las cadenas se consigue sobre todo mediante calentamiento.

Digestión de DNA es el procedimiento mediante el cual se obtienen fragmentos de DNA amplificado por acción de una enzima de restricción.

DNA diana indica la región de DNA genómico que se pretende amplificar mediante PCR.

DNA genómico es el DNA total de origen nuclear.

Dominio de una proteína es una parte discreta de la secuencia de aminoácidos que se puede asimilar con una función en particular.

Elemento estimulador o potenciador (enhancer) es una secuencia de acción en cis que aumenta la utilización de (algunos) promotores eucarióticos, y que pueden funcionar en cualquier orientación y en cualquier localización (corriente arriba o corriente abajo) con relación al promotor.

Endonucleasas son enzimas que rompen uniones dentro de una cadena de un ácido nucleico.

Enzimas de restricción son las que reconocen secuencias cortas específicas del DNA y rompen el dúplex (a veces en un sitio diana, a veces en otro, dependiendo del tipo).

Exón es cualquier segmento de un gen interrumpido que está representado en el producto del RNA maduro.

Familia Alu es un conjunto de secuencias dispersas y emparentadas, cada una de ellas de unos 300 pb de longitud, del genoma humano. Cada miembro individual tiene puntos de separación Alu en cada extremo (de ahí el nombre).

Fenotipo es el aspecto u otras características de un organismo, que resulta de la interacción de su constitución genética con el medio.

Frecuencia de mutación es la frecuencia con que un mutante particular se encuentra en la población.

Gen (cistrón) es el segmento de DNA involucrado en producir una cadena polipeptídica; comprende regiones que preceden y siguen a la región codificadora (líder y cola) así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificadores individuales (exones).

Genotipo es la constitución genética de un organismo.

Heterocigoto es un individuo con diferentes alelos en algún *locus* particular.

Homocigoto es un individuo con el mismo alelo en los *loci* correspondientes de cromosomas homólogos.

Huso describe la estructura reorganizada de una célula eucariótica que pasa a través de la división.

Intrón es un segmento de DNA que se transcribe, pero que es eliminado del interior de la transcripción por un empalme entre las secuencias de los segmentos (exones) situados a cada lado del mismo.

kb (kilobase) es una abreviatura correspondiente a mil pares de bases de DNA o mil bases de RNA.

Locus es la posición en un cromosoma en la que reside un gen para un rasgo particular; los *loci* pueden ser ocupados por cualquiera de los alelos del gen.

Luz o lumen describe el interior de un compartimento rodeado por membranas, por lo general el retículo endoplásmico.

Marcador (DNA) es un fragmento de tamaño conocido que se usa para calibrar un gel de electroforesis.

Mutación describe cualquier cambio en la secuencia del DNA del genoma.

Mutaciones puntuales son cambios que afectan a pares de bases únicos.

Oligonucleótidos son secuencias cortas de DNA con tamaños de aproximadamente 20 pb, que sirven como iniciadores en el PCR. Estos DNAs, conocidos también como "primers", flanquean la región de interés que se desea amplificar.

Palíndromo es una secuencia de DNA que es la misma cuando una cadena se lee de izquierda a derecha o la otra se lee de derecha a izquierda; consta de repeticiones invertidas o adyacentes.

pb (par de bases) es un apareamiento de A con T o de C con G en una doble hélice de DNA.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) describe una técnica en la que se utilizan ciclos de desnaturalización, cebado y extensión con DNA polimerasa para amplificar el número de copias de una secuencia diana de DNA hasta $> 10^6$ veces.

Poliadenilación es la adición de una secuencia de ácido poliadenílico al extremo 3' de un RNA eucariótico después de su transcripción.

Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) se refiere a diferencias heredadas en los sitios de corte para las enzimas de restricción (por ejemplo, producidos por cambios de bases en el lugar diana) que dan lugar a diferencias en las longitudes de los fragmentos producidos por separación con la correspondiente enzima de restricción.

Polimorfismo se refiere a la presencia simultánea en la población, de genomas que muestran variaciones alélicas (como se ven bien en alelos que producen fenotipos diferentes o, por ejemplo, en cambios en el DNA que afectan el patrón de restricción).

Promotor es una región del DNA que participa en la unión de la RNA polimerasa para iniciar la transcripción.

Proteolítica es la reacción que comprende la hidrólisis de las uniones peptídicas de las proteínas.

Protrombina es una glucoproteína de cadena sencilla que participa en las últimas etapas de la cascada de coagulación. La protrombina es convertida a trombina y ésta a su vez convierte al fibrinógeno en coágulo de fibrina insoluble.

Protrombina G20210A se refiere al nombre que se le ha dado a la transición de una Guanina por una Adenina en el nucleótido que se encuentra en la posición 20210 del gen de la protrombina.

Puntos de empalme o sitios de empalme son secuencias inmediatamente circundantes a los límites exón-intrón.

RE liso consta de una región de retículo endoplásmico carente de ribosomas.

RE rugoso consta de un retículo endoplásmico asociado a ribosomas.

Regla GT-AG es la que describe la presencia de estos dinucleótidos constantes en las dos primeras y dos últimas posiciones de los intrones de los genes nucleares.

Repeticiones directas son secuencias idénticas (o parecidas) que se encuentran en dos o más copias en la misma orientación y en la misma molécula del DNA; no son necesariamente adyacentes.

Repeticiones en tándem son copias múltiples de la misma secuencia colocadas en tándem.

RNA polimerasa es una enzima que sintetiza RNA utilizando un molde de DNA (descrita formalmente como RNA polimerasa dependiente de DNA).

Secuencia consenso es una secuencia idealizada en la que cada posición representa la base que con mayor frecuencia se encuentra cuando se comparan muchas secuencias reales.

Secuencia guía o líder de una proteína es una corta secuencia amino-terminal responsable del paso hacia dentro o a través de una membrana.

Secuencia interventora es un intrón.

Secuencia señal es la región de la proteína (por lo general amino-terminal) responsable de la inserción co-traducciona en las membranas del retículo endoplásmico.

Secuenciación se refiere a la reacción de amplificación empleada para determinar la secuencia de pares de bases de un DNA determinado.

Serinproteasas es una familia de enzimas proteolíticas que contienen una serina altamente reactiva.

Taq DNA polimerasa DNA polimerasa obtenida de *Thermophilus aquaticus*, la cual es resistente a altas temperaturas y se emplea en las reacciones de PCR.

Transcripción es la síntesis del RNA sobre un molde de DNA.

Transcrito primario es el RNA producto original y no modificado que corresponde a una unidad de transcripción.

Transición es la forma más frecuente de mutación puntual que consiste en la sustitución de una pirimidina por otra, o de una purina por otra; se reemplaza una bases G-C por A-T o viceversa.

Traslocación de una proteína se refiere a su movimiento a través de una membrana.

Trombosis se refiere a la formación de un coágulo sanguíneo o trombo, de ordinario bajo condiciones anormales, dentro de un vaso sanguíneo.

Zimógeno es la forma inactiva de una serinproteasa que circula en el plasma.

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia.
Da	Daltones.
dATP	Desoxi-adenosin-trifosfato.
dCTP	Desoxi-citidín-trifosfato.
dGTP	Desoxi-guanosin-trifosfato.
dTTP	Desoxi-timidín-trifosfato.
dNTP's	Desoxi-nucleótido-trifosfatos.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
factor Va	Factor V activado.
factor VIIa	Factor VII activado.
factor VIIIa	Factor VIII activado.
factor IXa	Factor IX activado.
factor Xa	Factor X activado.
factor XIa	Factor XI activado.
factor XIIa	Factor XII activado.
FT	Factor Tisular.
A	Adenina.
C	Citosina.
G	Guanina.
T	Timina.
GLA	Dominio GLA (residuos de γ -carboxiglutamato)
G20210A	Sustitución del nucleótido G por A en la posición 20210 del gen de la Protrombina Humana.
kb	Kilobases.
ml	Mililitro.
μl	Microlitro.
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero.
ng/μl	Nanogramos por microlitro.
nm	Nanómetros.
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PTH-1	Oligonucleótido que flanquea una región del gen de la protrombina en dirección 5' 3'
PTH-2	Oligonucleótido que flanquea una región del gen de la protrombina en dirección 3' 5'
RCLB	Buffer de lisis de glóbulos rojos.
RE	Reticulo Endoplásmico.
RER	Reticulos Endoplásmico Rugoso.
RNA	Ácido Ribonucleico.
rpm	Revoluciones por minuto.
Taq I	Endonucleasa de restricción extraída de <i>Thermophilus aquaticus</i> .
U/μl	Unidades por microlitro.
UV	Luz ultravioleta.
V	Volts.
WCLB	Buffer de lisis de glóbulos blancos.

ABREVIATURAS DE LOS AMINOÁCIDOS

<i>Aminoácido</i>	<i>Abreviatura de tres letras</i>	<i>Abreviatura de una letra</i>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
Glicina o glicocola	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V
Cualquier aminoácido		X

RESUMEN

La protrombina humana es una glucoproteína de cadena sencilla que contiene aproximadamente 8.2% de hidrato de carbono. Es sintetizada en el hígado dependiente de la vitamina K y secretada al torrente sanguíneo, donde circula como zimógeno (forma inactiva) de una proteasa de serina.

La protrombina es el precursor de la trombina, el efector final de la cascada de coagulación que conduce a la formación del coágulo insoluble de fibrina. La protrombina es una enzima clave en el equilibrio entre procoagulación y anticoagulación porque promueve la coagulación por retroalimentación positiva y también promueve la anticoagulación mediante la activación de la vía de la proteína C.

El gen que codifica la protrombina humana se localiza en el cromosoma 11, en la posición p11-q12, contiene cerca de 21 kb de DNA y está compuesto por 14 exones separados por 13 intrones.

Recientemente se ha descrito una variante genética del gen de la protrombina asociada con un aumento de riesgo de trombosis. Esta mutación está localizada en la región 3'-no codificante (3'UTR) de este gen y consiste en la sustitución del nucleótido G por el nucleótido A en la posición 20210.

Desde el punto de vista funcional se ha demostrado que esta mutación se asocia a un aumento de los niveles plasmáticos de protrombina (elevaciones de hasta un 30% con respecto a los no portadores de dicha mutación), y dado que la elevación de los niveles de protrombina constituye por sí misma un factor de riesgo de trombosis venosa, se ha atribuido a esta razón la asociación del alelo 20210A a trombosis.

Dada la relación que se ha establecido entre la mutación G20210A y las enfermedades vasculares a lo largo de numerosos estudios, y considerando que aun no se conoce la frecuencia de dicha mutación en nuestra población, se determinó la frecuencia del alelo 20210A en una muestra de la población mexicana aparentemente normal, obteniendo como resultado una frecuencia igual a 1.5%, resultado que se encuentra dentro del rango general establecido entre 1 y 4% para población general.

Como parte de un proyecto encaminado a conocer las principales determinantes genéticas que suponen un factor de riesgo de tipo genético, y por lo tanto, hereditario, los resultados obtenidos en el presente estudio serán de gran utilidad para compararlos con las frecuencias obtenidas para los pacientes con enfermedades vasculares y poder establecer la relación de la mutación G20210A con esta enfermedad en nuestra población.

1. MARCO TEORICO

1.1. Antecedentes.

Los factores de la coagulación fueron descubiertos cuando los pacientes con larga historia de problemas hemorrágicos fueron atendidos médicamente. Los estudios de estos pacientes afectados revelaron que ciertas proteínas eran funcionalmente deficientes, de esta manera comenzaron a ser analizados.¹

La consideración histórica de la protrombina como precursor de la trombina fue descrita por primera vez en 1905 por Morawitz. Aunque la protrombina era sólo una sustancia hipotética en ella, la "teoría clásica" de la coagulación propuesta por Morawitz fue básicamente una teoría de la activación de la protrombina.²

El primer nombre que se le dio a la protrombina fue *trombógeno*, postulado para ser el precursor del llamado "fermento de fibrina", conocido más tarde como *trombina*.³

Los primeros preparados de protrombina fueron obtenidos por Seegers y colaboradores en 1938.³ Inicialmente los estudios de la protrombina fueron realizados por Magnusson y colaboradores en la proteína de origen bovino, deduciendo su estructura primaria parcial en 1975. Posteriormente y de manera simultánea en 1977 Walz⁴ y Thompson obtuvieron la estructura primaria parcial de la protrombina humana. En ese mismo año Butkowski y colaboradores obtuvieron la estructura primaria completa de la protrombina humana y ubicaron los sitios de glicosilación de la protrombina 2, el precursor inmediato de la trombina.⁵ Estos trabajos llevaron a las observaciones iniciales acerca de la relación estructura-función de la molécula.

McGillivray y Davie (1984) aislaron la secuencia complementaria del DNA para la molécula de protrombina bovina. Subsecuentemente, Degen (1983), determinaron la secuencia del DNA complementario y la estructura del gen que codifica para la molécula de protrombina humana.⁶

En 1987, Royle, descubrió que el gen de la protrombina se encuentra localizado en el cromosoma 11 cerca del centrómero.⁷

Siguiendo al descubrimiento de la protrombina y el desarrollo de métodos para su análisis, comenzaron a reportarse numerosos casos de anomalías en esta molécula. Inicialmente se describieron casos de pacientes con hipoprotrombinemia y más tarde se diferenciaron de aquellos con disprotrombinemia; fue así que se comenzaron a describir las diferentes variantes genéticas de esta proteína.

La trombofilia hereditaria fue descrita inicialmente en 1965 en una familia Noruega con actividad disminuida de antitrombina (un inhibidor de trombina). En 1996 Poort, reportaron un polimorfismo en la región 3' no traducida del gen de la protrombina, denominado G20210A, que se asocia con un riesgo incrementado de trombosis y con niveles elevados de protrombina en plasma.⁸

Estudios posteriores han encontrado también esta asociación, y se ha extendido el riesgo de trombofilia a trombosis arterial, así como a eventos recurrentes, complicaciones durante el embarazo y asociaciones con otros defectos genéticos.

1.2. Hemostasia.

La sangre normalmente circula dentro de un sistema cerrado de vasos. Una lesión traumática secciona vasos sanguíneos y resulta en hemorragia. Para minimizar la pérdida de sangre, normalmente se movilizan plaquetas inertes y las proteínas disueltas en el plasma que forman una masa insoluble o barrera estructural que ocluye los vasos lesionados. La barrera se limita al sitio de lesión de manera tal que la circulación se mantiene en los vasos de otras partes del cuerpo. Los mismos elementos proporcionan un sistema continuo de vigilancia que en circunstancias normales evita el escape de plasma y de células al interior de los tejidos.

Al proceso de formación de una barrera contra la pérdida de sangre y su limitación en el sitio lesionado se le llama *hemostasia*. La masa de la barrera se conoce como *tapón hemostático*, *coágulo sanguíneo* o *trombo*, y se forma por el proceso de *coagulación de la sangre*.

La hemostasis se produce en etapas llamadas hemostasia primaria, hemostasia secundaria y fibrinólisis. Durante la hemostasia primaria, las plaquetas interactúan con ellas mismas y con los vasos lesionados. Como resultado de esta interacción se forma un conjunto de plaquetas y en este punto el tapón hemostático se conoce como tapón hemostático primario, el cual detiene temporalmente la hemorragia, pero es frágil y fácilmente se desprende de la pared vascular, por lo que subsecuentemente se depositan tiras de fibrina sobre el tapón de plaquetas primario para hacerlo fuerte y estable y permitir la reparación de la herida sin pérdida adicional de sangre. La generación de fibrina constituye la etapa de hemostasia secundaria. La fibrina se forma mediante una serie de reacciones bioquímicas complejas de algunas proteínas del plasma llamadas factores de la coagulación, al vincularse con los vasos sanguíneos lesionados y con el tapón de plaquetas. El tapón o coágulo, se llama entonces tapón hemostático secundario. Después que la herida se ha reparado, componentes adicionales del sistema hemostático desdoblan y retiran el coágulo en la etapa de

fibrinólisis. Todas las fases y componentes del sistema hemostático se controlan por inhibidores fisiológicos y bioquímicos.^{1,9}

Durante la hemostasia primaria los vasos sanguíneos y la plaquetas forman juntos un agregado de plaquetas que llena mecánicamente las aberturas de los vasos sanguíneos lesionados y detiene la hemorragia de la herida. Los vasos lesionados contribuyen por medio de constricción o estrechamiento de la luz para reducir el flujo de sangre al área lesionada y el escape de ésta en el sitio de la herida.¹ Este espasmo vascular local dura muchos minutos o incluso horas; durante este período tienen lugar los procesos de taponamiento plaquetario y coagulación de la sangre.¹⁰ El mecanismo no se conoce bien en su totalidad; en parte esto es causado por factores neurogénicos y parcialmente por varias moléculas reguladoras las cuales interactúan con los receptores en la superficie de la pared celular de los vasos sanguíneos. Las moléculas incluyen a la serotonina y al tromboxano A₂, ambos productos de la activación de la plaqueta, y de la endotelina producida por las células endoteliales. Estas sustancias ayudan a la prolongación de la vasoconstricción. En contraste, las células endoteliales sintetizan y secretan una prostaglandina, la PGI₂, llamada también prostaciclina, la cual contrarresta la constricción y causa vasodilatación. La vasodilatación aumenta el suministro sanguíneo en el área lesionada y produce enrojecimiento de la piel.

Inicialmente las plaquetas son activadas y adheridas a las áreas lesionadas de las paredes de los vasos sanguíneos. Inmediatamente después las plaquetas se agregan para formar un tapón plaquetario que reduce o detiene temporalmente la pérdida de sangre. La activación de las plaquetas provoca a su vez la liberación de numerosas proteínas y pequeñas moléculas almacenadas en sus gránulos. Las sustancias secretadas ayudan a atraer y activar a nuevas plaquetas que se adicionan al agregado y aceleran el crecimiento del tejido nuevo el cual repara permanentemente la herida. Las proteínas plasmáticas, tales como el factor de von Willebrand juegan un papel importante en la adhesión plaquetaria ya que intervienen en la unión entre las plaquetas activadas y el subendotelio.¹¹

La hemostasia secundaria se produce cuando las proteínas plasmáticas solubles, llamadas factores de coagulación interactúan en una serie de reacciones enzimáticas complejas para convertir a la proteína soluble fibrinógeno en fibrina insoluble¹. Bajo condiciones fisiológicas normales, los factores de coagulación circulantes se encuentran en su forma inactiva (zimógenos), que se transforman en enzimas activas mediante un proceso de activación secuencial que generalmente consiste en el rompimiento de uno o dos enlaces peptídicos.⁹ Las reacciones se realizan a manera de cascada o catarata, cada zimógeno actúa primero como un sustrato y luego como una enzima. El sustrato final en la cascada es el fibrinógeno y cuando recibe la acción de la enzima final, trombina, se convierte en fibrina. La activación de la cascada de coagulación se inicia cuando los zimógenos se exponen a las capas subendoteliales de los vasos. Todas las reacciones enzimáticas, excepto la última (la formación de fibrina a partir del fibrinógeno), requieren un fosfolípido de superficie

proporcionado por las membranas de las plaquetas activadas y por los vasos lesionados. El requerimiento de una superficie es importante ya que limita el lugar de las reacciones y de la formación de fibrina al sitio de la lesión.

Todas las enzimas en la cascada, con excepción del factor XIII (una transaminasa), son proteasas de serina o serinproteasas, que actúan como enzimas de escisión con actividad de proteasa en el sitio de un residuo de serina. Las reacciones originales se amplían muchas veces por medio de factores de coagulación no enzimáticos (cofactores) y de activación por retroalimentación positiva.

La fibrina forma una malla en el tapón hemostático primario plaquetario en forma de telaraña y produce una barrera física estable que evita el escape de la sangre. La barrera, conocida a veces como coágulo, es temporal y realiza su propósito únicamente hasta que se repara la pared endotelial del vaso. El proceso de formación de la fibrina es controlado mediante retroalimentación negativa; cantidades abundantes de trombina, la última enzima formada en la cascada, destruyen los cofactores de la cascada de coagulación en las etapas limitantes de la velocidad de su propia producción. Como resultado se presenta un mecanismo de verificación y equilibrios el cual evita que cualquiera de los procesos se vuelva demasiado potente.¹

El proceso de coagulación se divide tradicionalmente en tres vías con base en el modo y secuencia de activación de las proteínas de la coagulación in vitro: las vías intrínseca, extrínseca y común. Cada uno de los 13 factores de la coagulación está asignado a una de estas vías. La vía intrínseca se activa por el contacto de las proteínas de la coagulación con superficies cargadas negativamente, mientras que la vía extrínseca lo es por el contacto del factor tisular. Las vías intrínseca y extrínseca convergen en la llamada vía común.

Además de dividirse en tres vías con base en las funciones secuenciales desempeñadas en la hemostasia, los factores de coagulación se pueden dividir en tres grupos según sus propiedades físicas: grupo del fibrinógeno, grupo de contacto y grupo de la protrombina.

Grupo del fibrinógeno

El grupo del fibrinógeno incluye a los factores I, V, VIII y XIII. Este grupo de factores también se conoce como el grupo consumible ya que se consumen durante la formación de la fibrina y, por tanto, están ausentes en el suero. Los factores I, V y XIII tienen masas moleculares de 300 000 a 340 000 daltones. El factor VIII es un complejo macromolecular con un peso molecular de aproximadamente 1 200 000 daltones.

Grupo de contacto

El grupo de contacto incluye a los factores XI y XII, así como a las proteínas del plasma, precalicreína, y a los cininógenos de alto peso molecular (CAPM). Estos factores están implicados en la activación inicial de la vía intrínseca de la coagulación y requieren del contacto con una superficie cargada negativamente para su actividad.

Grupo de la Protrombina

El grupo de la protrombina incluye a los factores II, VII, IX y X. Estos factores tienen una masa molecular que se extiende de 50 000 a 100 000 Da. Son necesarios iones de calcio para el enlace de los factores de la protrombina a una superficie fosfolipídica ácida en la cual se produce la activación de la enzima.

Los factores que conforman este grupo también se conocen como factores dependientes de la vitamina K, debido a que requieren de esta vitamina para ser funcionales. Por tanto, en ausencia de vitamina K los factores se sintetizan en el hígado y pueden encontrarse en el plasma, pero son totalmente no funcionales debido a que no pueden enlazarse a las superficies fosfolípicas.¹

1.2.1. Cascada de la coagulación.

Los mecanismos que inician el proceso de coagulación se ponen en funcionamiento por: 1) el traumatismo de la pared vascular y de los tejidos adyacentes; 2) el traumatismo de la sangre, o 3) el contacto de la sangre con las células endoteliales dañadas o con colágeno y otros elementos tisulares en el exterior del vaso sanguíneo. En todos los casos, se forma el *activador de la protrombina*, que transforma la protrombina en trombina e inicia todos los pasos posteriores de la coagulación.

En general, se considera que el activador de la protrombina se forma por dos vías, aunque, en realidad, las dos vías interactúan constantemente: 1) la vía extrínseca, que comienza con el traumatismo de la pared vascular y de los tejidos adyacentes, y 2) la vía intrínseca, que se inicia en la propia sangre.¹⁰

1.2.1.1. Vía extrínseca de la coagulación.

La vía extrínseca (Figura 1) que inicia la formación del activador de la protrombina comienza cuando una pared vascular o un tejido extravascular sufre un traumatismo y entra en contacto con la sangre.

1. Liberación del factor tisular. El tejido lesionado libera un complejo de varios factores llamado factor tisular o tromboplastina tisular, que se compone en especial de fosfolípidos de las membranas tisulares y de un complejo lipoproteico que actúa sobre todo como una enzima proteolítica.
2. Activación del factor X: importancia del factor VII y del factor tisular. El complejo lipoproteico del factor tisular se une en un complejo con el factor VII de la coagulación y, en presencia de iones de calcio, actúa enzimáticamente sobre el factor X activado (Xa).
3. Efecto del factor Xa para formar el activador de protrombina: papel del factor V. El factor Xa se combina de inmediato con los fosfolípidos tisulares que integran el factor tisular, o con los fosfolípidos adicionales liberados de las plaquetas, así como con el factor V para dar el complejo llamado activador de la protrombina. A los pocos segundos y en presencia de iones calcio (Ca^{++}), éste rompe a la protrombina para formar trombina y el proceso de coagulación prosigue como antes. Al principio, el factor V del complejo activador de la protrombina está inactivo, pero una vez que comienza la coagulación y se empieza a producir trombina, la acción proteolítica de ésta activa el factor V. Éste acelera entonces mucho la activación de la protrombina. Así pues, dentro del complejo final activador de la protrombina, el factor Xa es la proteasa verdadera que rompe a la protrombina en trombina, el factor Va acelera enormemente esta actividad proteasa, y los fosfolípidos plaquetarios actúan como un vehículo que acelera aún más el proceso. La trombina ejerce un efecto de retroalimentación positiva actuando a través del factor V acelerando todo el proceso una vez iniciado.¹⁰

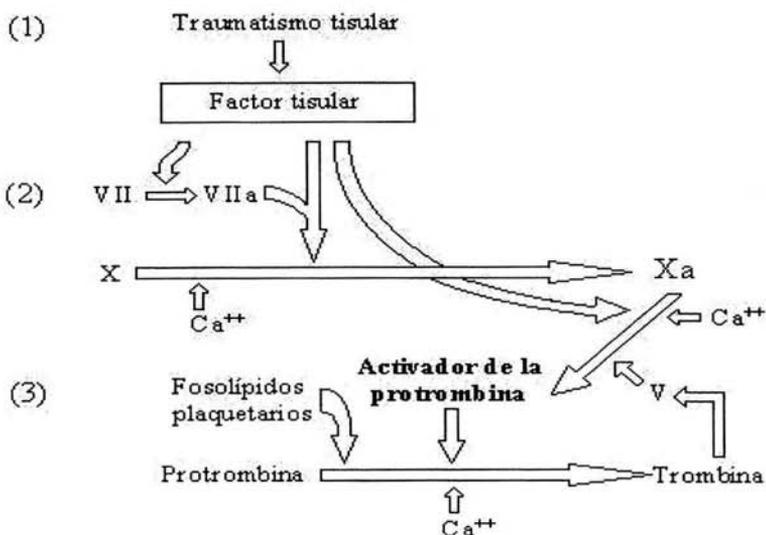


Figura 1. Vía extrínseca para iniciar la coagulación de la sangre.¹⁰

1.2.1.2. Vía intrínseca de la coagulación.

El segundo mecanismo para iniciar la formación del activador de la protrombina (Figura 2), y por tanto la coagulación, comienza con el traumatismo de la propia sangre o con la exposición de la sangre al colágeno procedente de la pared de un vaso sanguíneo lesionado; el proceso continúa con una serie de reacciones en cascada:

1. El traumatismo sanguíneo produce: 1) la activación del factor XII, y 2) la liberación de fosfolípidos plaquetarios. El traumatismo sanguíneo o la exposición de la sangre al colágeno de la pared vascular altera dos factores importantes de la coagulación de la sangre: el factor XII y las plaquetas. Cuando se altera el factor XII, como ocurre al entrar en contacto con el colágeno o con una superficie humectable como el vidrio, adquiere una nueva configuración molecular que lo convierte en una enzima proteolítica llamada «factor XII activado». Al mismo tiempo, el traumatismo sanguíneo lesiona las plaquetas como consecuencia de su adhesión, bien al colágeno, o a una superficie humectable (o por otro mecanismo); de esta forma se

liberan fosfolípidos plaquetarios que contienen la lipoproteína llamada factor plaquetario 3, que también interviene en las reacciones de coagulación posteriores.

2. Activación del factor XI. El factor XII activado actúa enzimáticamente sobre el factor XI para activarlo, lo que constituye el segundo paso de la vía intrínseca. Esta reacción también necesita cininógeno de alto peso molecular y se acelera por la precalicreína.
3. Activación del factor IX por el factor XI activado: El factor XI activado actúa entonces sobre el factor IX de forma enzimática para activarlo.
4. Activación del factor X: papel del factor VIII. El factor IX activado, junto al factor VIII activado y con los fosfolípidos plaquetarios y el factor 3 de las plaquetas lesionadas, activa el factor X. De esta manera, cuando disminuye el aporte de factor VIII o de plaquetas, este paso resulta deficiente. El factor VIII es el factor ausente en las personas con hemofilia clásica, por lo que se conoce como factor antihemofílico.
5. Acción del factor X activado para formar el activador de la protrombina: papel del factor V. Este paso de la vía intrínseca coincide con el último de la vía extrínseca. Es decir, el factor X activado se combina con el factor V y los fosfolípidos plaquetarios o tisulares para formar el complejo llamado activador de la protrombina.¹⁰

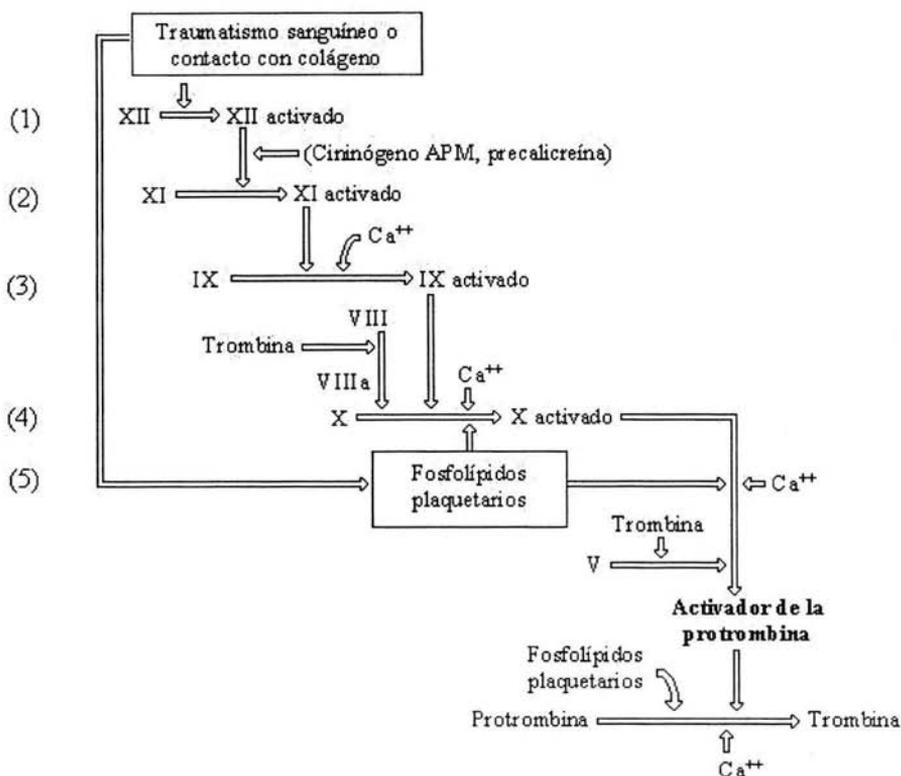


Figura 2. Vía intrínseca para iniciar la coagulación de la sangre.¹⁰

1.2.2. Propiedades estructurales de los componentes del sistema de activación de la Protrombina.

Bajo condiciones fisiológicas, la activación de la protrombina para formar trombina incluye cinco componentes³: En primer lugar se encuentra la protrombina como sustrato de activación, los factores Xa, Va, iones de calcio y fosfolípidos.

Factor X

El Factor X de la coagulación es una glicoproteína compuesta por dos cadenas polipeptídicas, una pesada y una ligera que se encuentran unidas por un enlace disulfuro.¹² El gen que codifica para

esta proteína se localiza en el cromosoma 13 q34 y se compone de 8 exones y 7 intrones, con un tamaño aproximado de 25 kb.^{13,14} Esta proteína forma parte del grupo de los factores dependientes de vitamina K, se sintetiza en el hígado y está compuesto de 8 segmentos, cuatro lo suficientemente grandes para ser considerados como dominios, y cuatro péptidos intermedios entre los dominios homólogos mayores. Los cuatro dominios mayores son: Un dominio GLA (que contiene 11 residuos de γ -carboxiglutamato), dos dominios homólogos EGF (EGF-1 y EGF-2), y un dominio serinproteasa (que posee la actividad proteolítica).¹⁴

La activación de este zimógeno implica el rompimiento de un enlace peptídico sencillo (Arg-Ile) en la cadena pesada. Los principales catalizadores o activadores fisiológicos del Factor X son: El complejo Factor Tisular (FT) : Factor VIIIa (en la vía extrínseca), y el complejo Factor VIIIa : Factor IXa (en la vía intrínseca). De esta manera se obtiene la forma activa del Factor X, el Factor Xa.^{12,15}

Factor V

El Factor V es una glicoproteína de una sola cadena de 2196 aminoácidos.¹² El gen que lo codifica se localiza en el cromosoma 1 q21 a 25 y es un gen de 80 kb que contiene 24 intrones.¹⁴ Esta proteína se caracteriza por contener tres dominios homólogos A, un amplio dominio B, y un par de dominios homólogos C: AABACC.⁹ El Factor V no es una enzima, sino un cofactor que fija un complejo enzimático a receptores específicos de la membrana de la célula endotelial o de la plaqueta, y permite que la reacción enzimática proceda con eficiencia.¹²

La activación de este factor requiere el rompimiento de dos enlaces peptídicos (Arg₇₁₀-Ser y Arg₁₅₄₅-Ser) en la proteína precursora. El rompimiento de estos enlaces causa la liberación o exposición de una amplia región interna de unión, y la generación de dos cadenas; una cadena pesada amino-terminal, y una cadena ligera carboxi-terminal. Estas cadenas se mantienen unidas por iones de calcio y constituyen el Factor Va, que participa como cofactor en la activación de la protrombina incrementando la velocidad de esta reacción alrededor de 1000 veces.¹¹ El Factor V circula en la sangre tanto en plaquetas (cerca del 20% del total de Factor V sanguíneo), y como proteína soluble en plasma (cerca del 80%). La enzima más importante en su activación es la trombina, que mediante un mecanismo de retroalimentación positiva actúa sobre este factor.¹⁵

Iones de Calcio

Los iones de calcio (Ca²⁺) participan virtualmente en cada reacción en el proceso de coagulación sanguínea. Sus efectos se observan directamente en los procesos proteolíticos, en la unión de proteínas a fosfolípidos, en las proteínas plaquetarias y en las reacciones de liberación de plaquetas. En la activación de la protrombina, los iones de calcio alteran el rango de escisión de la protrombina

tanto por el factor Xa como por la trombina. Los iones de calcio también participan en la unión de la protrombina y el factor Xa a la superficie de la membrana bicapa de fosfolípidos, induciendo cambios conformacionales en la molécula de protrombina que permiten esta unión.¹⁶

Fosfolípidos

La rápida producción de trombina que ocurre como resultado de la interacción de las proteínas involucradas, es restringida al sitio en el cual todos estos componentes están presentes y pueden interactuar.³ Desde que el "sitio" común para dicha interacción es una superficie de fosfolípidos, ya sea de membranas celulares o de plaquetas (todos los componentes interactúan con ambas superficies), parece casi seguro que estas superficies membranales proveen el espacio de "organización" necesario para la interacción. El requerimiento de moléculas fosfolípicas cargadas negativamente, y su distribución relativa por dentro y fuera de las membranas celulares, provee un mecanismo plausible por el cual un "sitio" de la superficie puede aparecer concomitantemente con la herida y la ruptura de la membrana celular.¹⁷ La interacción de los componentes en el "sitio" mencionado, provee también de un mecanismo por el cual, el proceso de coagulación sanguínea se restringe únicamente al lugar donde se produjo el daño.^{18,19}

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas que existen en solución acuosa como capa bimolecular o bicapa lipídica. Esto ocurre debido a que sus cadenas de ácido graso hidrofóbicas son excluidas del ambiente acuoso, mientras que sus cabezas polares mantienen el contacto con el medio. Estas capas bimoleculares constituyen la mayor parte de las membranas celulares y organelos subcelulares.²⁰

Protrombina y Trombina

La protrombina o factor II de la coagulación es una proteína que se sintetiza en el hígado y se secreta al torrente sanguíneo, donde circula como zimógeno de una serinproteasa.^{3,21} La protrombina participa en las etapas finales del proceso de coagulación donde es convertida por escisión proteolítica, a su forma enzimáticamente activa trombina.²² La protrombina juega un papel central tanto en coagulación como en anticoagulación, ya que está involucrada en la estimulación de las plaquetas para que realicen un cambio morfológico, es quimiotáctica para macrófagos, e interviene en la regulación y proliferación de numerosas células, entre ellas las células endoteliales.^{22,23} Una vez activada, la protrombina da lugar a la trombina, enzima que lleva a cabo los procesos finales de la coagulación sanguínea, donde escinde a los fibrinopéptidos A y B del extremo amino-terminal de las cadenas α y β del fibrinógeno, para producir monómeros de fibrina que espontáneamente polimerizan para formar el coágulo de fibrina.^{3,18} La protrombina y la trombina son miembros de una

familia de proteínas cuya síntesis depende de la vitamina K. La protrombina es la más abundante de estas proteínas.

1.2.3. Mecanismos de activación de la Protrombina.

La protrombina humana puede ser activada por dos vías que envuelven principalmente el rompimiento de dos enlaces peptídicos:¹⁸

- 1) En ausencia del factor Va la protrombina puede ser activada por el factor Xa a un rango muy lento, en presencia de iones de calcio. La primera ruptura (Figura 3, paso 1) ocurre en Arg271-Thr272, dando lugar al fragmento 1-2 y pretrombina 2. La escisión de la pretrombina 2 en Arg320-Ile321 (Figura 3, paso 2) da lugar al fragmento 1-2 y trombina, la cual se encuentra unida por medio de un enlace disulfuro. Escisiones adicionales por la trombina ocurren en los residuos Arg155 y Arg284 durante el proceso de activación. La escisión en Arg284 en la cadena A de la trombina resulta en la remoción de los residuos 1-13 del extremo amino-terminal de la trombina, lo que da lugar a la forma estable de la trombina.
- 2) La velocidad de activación de la protrombina por el complejo de la protrombinasa (factores Xa, Va, iones de calcio y fosfolípidos) se incrementa 300, 000 veces con respecto a la activación por el factor Xa.²⁴ En presencia del factor Va, la activación de la protrombina procede con un orden invertido de escisiones. El rompimiento inicial ocurre en Arg320-Ile321 (Figura 3, paso 3), dando lugar al intermediario meizotrombina.¹⁸ La meizotrombina es subsecuentemente escindida en Arg271-Thr272 (Figura 3, paso 4), generando fragmento 1-2 y el dominio catalítico trombina, que se compone de una cadena de 49 residuos de aminoácidos y una cadena pesada B de 259 residuos. Una vez que el sitio activo se ha generado, la trombina escinde su propia cadena en Arg284 para remover los residuos 1-13 del extremo amino-terminal, y dar lugar a un segmento de 36 residuos de aminoácidos que conforman la cadena ligera A de la trombina.²⁴

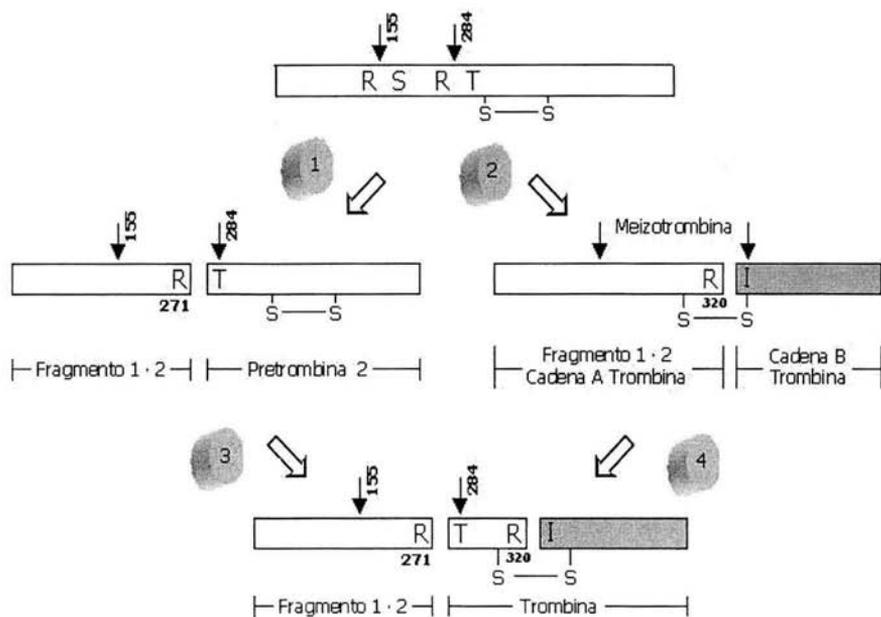


Figura 3. Vías de activación de la Protrombina. El factor Xa escinde a la molécula en las posiciones 271 (paso 1) y 320 (paso 2), mientras que la trombina escinde en los sitios 155 y 284. El complejo de la protrombinasa escinde de manera inversa, primeramente en el sitio 320 (paso 3) y posteriormente en 271 (paso 4). Ambas vías obtienen como producto a la trombina.²⁴

1.3. Protrombina.

1.3.1. Características bioquímicas de la Protrombina.

La protrombina humana es una glucoproteína (contiene aproximadamente 8.2% de hidrato de carbono) que consiste de una cadena polipeptídica sencilla con un peso molecular de 72, 000 Da (Tabla 1).^{22,24} Esta proteína es sintetizada principalmente en el hígado, aunque se han reportado niveles bajos de expresión en cerebro, diafragma, estómago, riñón, bazo, intestino, útero y placenta.³

Tabla 1. Bioquímica de la Protrombina.

Proteína	Peso Molecular	Cadena	Numero de Residuos GLA	Concentración Plasmática	Vida Media
Protrombina	72, 000 Da	Sencilla	10	100-150 µg/ml	60-70 h

La estructura completa de la protrombina humana ha sido determinada por medio de análisis secuencial de aminoácidos⁵ y deducida por secuenciación de clones de cDNA.⁶ La protrombina se compone principalmente de cuatro secuencias que son consideradas como dominios (Figura 4): El dominio GLA, dos estructuras de homología interna llamadas kringle, y una porción serinproteasa. La proteína madura que circula en el plasma está compuesta por 579 aminoácidos con una secuencia amino-terminal Ala-Asn-Thr-Phe-Leu, y tres cadenas de carbohidratos unidas al N. Estas cadenas se encuentran unidas a los residuos Asn78 y Asn100 en la primera estructura kringle y en Asn373 dentro del dominio serinproteasa de la molécula de protrombina.^{3,25}

En adición a los módulos funcionales encontrados en la proteína madura, la protrombina es sintetizada en el hígado como un pre-propéptido de 622 residuos de aminoácidos, la cual contiene una secuencia señal o prepéptido en el extremo amino-terminal cuya función es dirigirla hacia el RE. Siguiendo a esta secuencia señal se encuentra un propéptido de aproximadamente 18 aminoácidos que contiene a los residuos que servirán como punto de reconocimiento para la γ -carboxilasa,^{24,26} una carboxilasa microsomal presente en el RER que lleva a cabo la carboxilación post-traduccional de los residuos de ácido glutámico del extremo amino-terminal a γ -carboxiglutamato (GLA), y que requiere de la vitamina K para la biosíntesis de la protrombina ya que es el cofactor de esta enzima.²² Dichos residuos GLA son requeridos por la protrombina para fijar iones de calcio y ayudan en la unión de la proteína a superficies fosfolípicas.³ En ausencia de vitamina K, o en presencia de antagonistas de la vitamina K, la protrombina sintetizada circula en su forma no carboxilada que es funcionalmente inactiva ya que carece de la capacidad para unirse a las membranas.²² Siguiendo a la traslocación en el RE, la secuencia señal es removida por una peptidasa señal microsomal; el péptido es escindido siguiendo la carboxilación, antes de que la proteína sea secretada al plasma donde circula como zimógeno o precursor inactivo de la trombina.²⁴

La protrombina es estructuralmente homóloga a otros miembros de la familia de proteínas dependientes de la vitamina K; factores VII, IX y X; proteína C y S, que al igual que la protrombina requieren de esta vitamina para su síntesis.²⁴

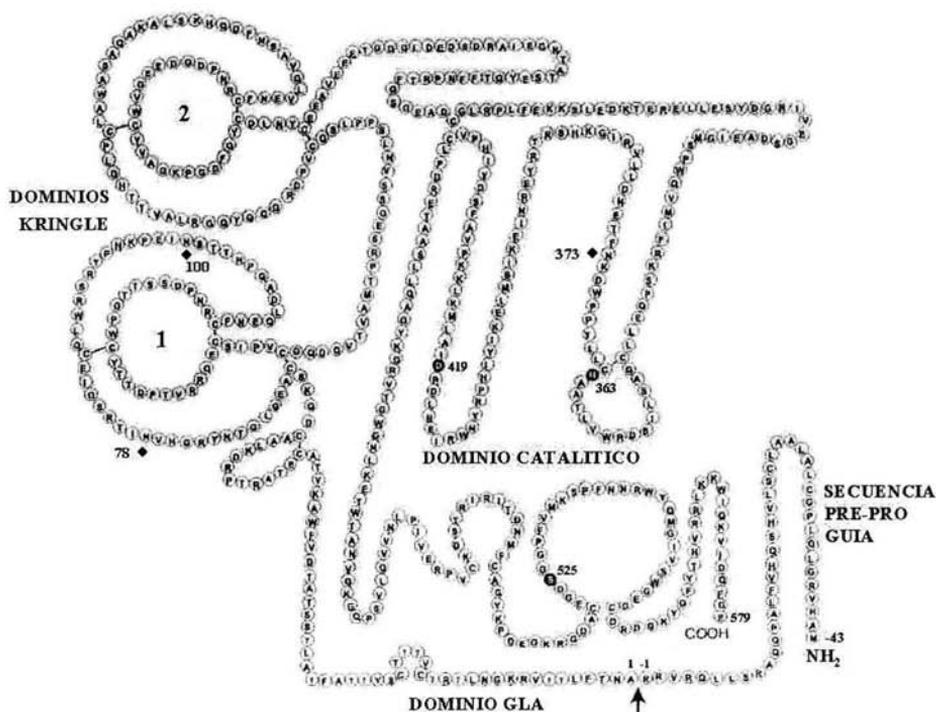


Figura 4. Estructura de la molécula de Protrombina.²⁴ La Protrombina se muestra como una cadena polipeptídica inmadura que contiene una secuencia prepro guía (residuos -43 a -1). El dominio GLA y el dominio kringle se localizan en los residuos 1 a 271. El dominio kringle se compone de las estructuras kringle 1 y kringle 2 señaladas en la figura. Las tres cadenas de carbohidratos unidas al N se indican con rombos en las posiciones 78, 100 y 373. El dominio catalítico contiene 259 residuos, incluyendo la llamada triada catalítica H363, D419 y S525.

1.3.2. Biosíntesis de la Protrombina.

Un número de pasos son requeridos para la biosíntesis de los factores dependientes de la vitamina K como lo es la protrombina. Inicialmente, el transcrito primario de mRNA es sintetizado en el núcleo del hepatocito y procesado por una reacción de "capping" en el extremo 5', la remoción del correspondiente RNA de los intrones y la poliadenilación en el extremo 3' del mRNA. Esto resulta en un mRNA maduro que es transportado desde el núcleo hacia el citoplasma de la célula.¹⁸ El mRNA de la protrombina humana es de aproximadamente 2, 000 nucleótidos (2 kb), e incluye 1, 866 nucleótidos que codifican para una secuencia prepro guía (constituida por un péptido señal y un

propéptido) y para la cadena polipeptídica madura.³ La traducción del mRNA maduro en la maquinaria ribosomal da como resultado una cadena polipeptídica inmadura de 622 aminoácidos que contiene la secuencia prepro guía de 43 residuos de aminoácidos (Figura 4). La remoción de esta secuencia por procesos proteolíticos da lugar a la proteína madura de 579 aminoácidos que circula en el plasma.^{18,24}



Figura 5. Secuencia prepro guía de la Protrombina Humana. La numeración de los residuos es relativa al extremo amino-terminal de la proteína madura que circula en el plasma.¹⁸

La secuencia prepro guía (Figura 5) contiene un iniciador metionina seguido de un intervalo altamente hidrofóbico que incluye a los residuos -37 a -26, y que es requerido para el transporte de la proteína hacia el lumen del RER durante la elongación polipeptídica. Esta secuencia prepro guía termina con un residuo de arginina justo antes de la alanina amino-terminal que está presente en la proteína madura.³ El tamaño del prepéptido o péptido señal de la molécula de protrombina aún no ha sido establecido. Como ya se había mencionado, el péptido señal de las proteínas va seguido de un propéptido¹⁸, que es un región importante para la carboxilación ya que sirve como sitio de reconocimiento para el complejo carboxilasa. Dicho complejo reconoce a los residuos de aminoácidos que se encuentran en las posiciones -18, -17, -16, -15 y -10.²⁴ La reacción de carboxilación se lleva a cabo post-traduccionalmente por una enzima de unión a membrana en una reacción que requiere CO₂, O₂, sustrato polipeptídico, NADH y vitamina K (Figura 6).²⁶

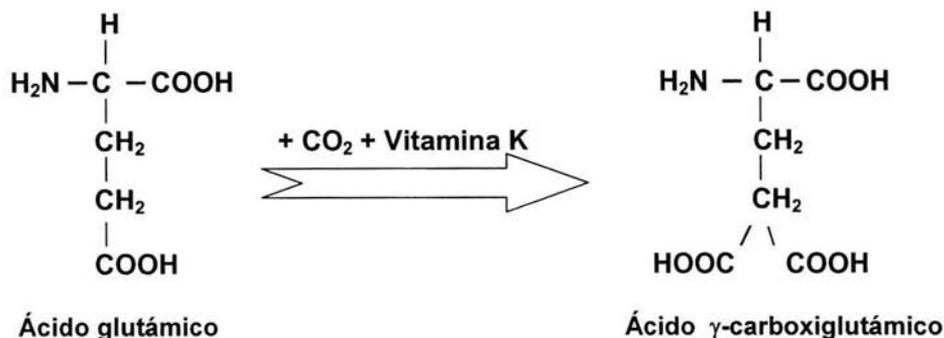


Figura 6. Gama carboxilación del ácido glutámico dependiente de la vitamina K. Todos los factores en el grupo de la Protrombina deben pasar por esta carboxilación de los residuos glutámicos para volverse funcionales, incluyendo a la Protrombina.

La unión peptídica Arg-Ala que se encuentra entre los residuos -1 y +1 de la molécula inmadura de protrombina, no es un sitio sobre el cual actúe la peptidasa señal, una enzima de rompimiento proteolítico, por lo tanto no es escindida por ésta. La peptidasa señal en cambio escinde la cadena polipeptídica prepro en una posición cercana al centro de la secuencia prepro guía en uno de los residuos de aminoácidos pequeños, como alanina, cisteína o serina. Este rompimiento deja como resultado al fragmento conocido como propéptido, que está formado por aproximadamente 18 a 24 aminoácidos que permanecen unidos a la cadena polipeptídica. El extremo carboxilo de este propéptido contiene residuos básicos altamente conservados entre las proteínas vitamina K-dependientes; dichos residuos sirven como sitio de reconocimiento para una segunda proteasa de procesamiento, que preferentemente rompe enlaces peptídicos que siguen un patrón -Arg-X-Lys, o como en el caso de la protrombina, Arg-Arg- (Figura 5). La liberación de este propéptido da como resultado la alanina amino-terminal que se observa en la cadena polipeptídica de la proteína madura.^{3,25}

Como muchas otras proteínas dependientes de la vitamina K, la protrombina es modificada por la adición de cadenas hidrocarbonadas en residuos de asparragina (unidas al N). La glicosilación co-traducciona de residuos específicos de asparragina que precedan a la secuencia consenso -Asn-X-Ser, o para el caso de la protrombina -Asn-X-Thr, ocurre en el RE y es catalizada por una transferasa. Subsecuentemente, los oligosacáridos unidos al N sufren un proceso por varias glicosilasas y glicosiltransferasas en el RE y en el aparato de Golgi, para generar estructuras complejas de carbohidratos que a menudo terminan con un residuo de ácido siálico.²⁵

1.3.3. Estructuras Funcionales de la Protrombina.

La molécula de protrombina consiste en una cadena polipeptídica simple que puede ser dividida estructuralmente (y funcionalmente de igual manera), en dos partes de aproximadamente la misma masa, una porción "Pro" y una porción "formadora de trombina" (Figura 7).¹⁷ Dichas porciones contienen a los dominios que conforman a la protrombina: el dominio GLA, que comprende los residuos 1 a 40; el dominio kringle formado por los residuos 65 a 143; el dominio kringle 2 por los residuos 170 a 248, y el dominio precursor de serinproteasa en los residuos 321 a 579.³

La porción "Pro", que se deriva del extremo amino-terminal de la molécula de protrombina, consiste en un polipéptido de 271 aminoácidos y de dos cadenas oligosacáridas. Esta porción puede ser adicionalmente dividida en dos dominios estructuralmente similares pero funcionalmente distintos: El fragmento 1 (residuos 1-155)⁴ y el fragmento 2 (residuos 156-271).^{3,17}

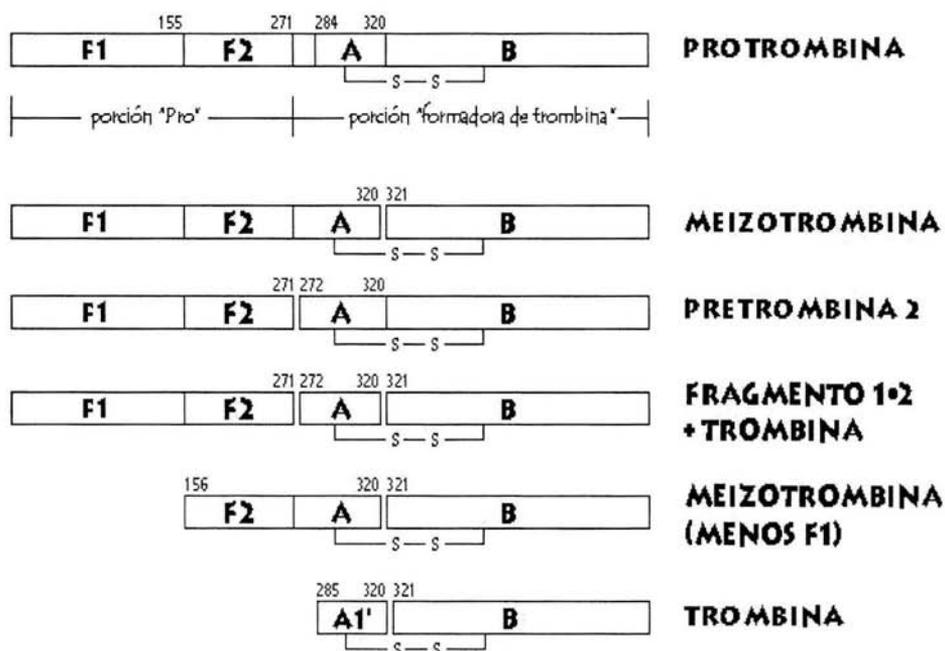


Figura 7. Estructuras funcionales derivadas de la Protrombina. F1 = Fragmento 1 de la Protrombina; F2 = Fragmento 2 de la Protrombina; A = Cadena ligera A de la trombina; B = Cadena pesada B de la trombina; A1' = Forma estable y enzimáticamente activa de la trombina.³

1.3.3.1. Fragmento 1 de la Protrombina (dominio GLA y kringle 1).

La trombina escinde a su zimógeno protrombina en el residuo 155 separando el dominio GLA y el kringle 1, del extremo carboxi-terminal de la molécula. El fragmento obtenido es llamado Fragmento 1 de la Protrombina. El dominio GLA se encuentra en los primeros 40 aminoácidos del extremo amino-terminal de la molécula, y está compuesto por 10 residuos de γ -carboxiglutamato.^{3,22} Seis de estos residuos se encuentran dispuestos en pares, aunque la significancia de esta característica, altamente conservada entre los factores de la coagulación dependientes de vitamina-K, no es clara.¹⁷ Estos residuos son producidos como consecuencia de la modificación dependiente de vitamina K que sufre la preprotrombina en el hígado. La carboxilasa dependiente de vitamina K asiste modificando la posición γ -hidrógeno de un residuo de ácido glutámico para formar γ -carboxiglutamato (Figura 6). Coincidente con la generación del aminoácido modificado, la forma reducida de la vitamina K es oxidada a epóxido; posteriormente la actividad reductasa presente en el hígado regenera la forma reducida de la vitamina K.^{3,24}

Los residuos de γ -carboxiglutamato son los responsables de mediar la asociación de la protrombina con las superficies fosfolípicas. La unión de iones de calcio al dominio GLA induce un cambio conformacional de la molécula de protrombina, de manera que se exponen los residuos hidrofóbicos a manera de "parche" en la superficie de la proteína.²⁴ Este "parche" permite que la proteína se inserte en la superficie de la membrana de fosfolípidos. Las formas no carboxiladas de los residuos carecen de actividad; ya que no llevan a cabo la transición conformacional (calcio-dependiente) que se requiere para la unión a fosfolípidos y para la presentación efectiva de la molécula al complejo de la protrombinasa.^{13,24}

Siguiendo al dominio GLA se encuentra una región hidrofóbica; un segmento pequeño que ya ha sido observado en varias proteínas de la coagulación y que consta de un grupo o pila de aminoácidos aromáticos (Figura 8), estos contienen la secuencia Phe-Trp-X-X-Tyr (Figura 4). Aunque esta región es hidrofóbica, se encuentra orientada hacia la superficie del fragmento 1 y pudiera estar involucrada en el proceso de unión a membrana de la molécula de Protrombina.^{9,13,24}

El fragmento 1 de la protrombina contiene también al dominio kringle 1. El dominio kringle 1 es una estructura de 79 aminoácidos, que muestra un plegamiento característico mayormente determinado por tres enlaces disulfuro entre cisteínas. El kringle 1 contiene también dos cadenas de carbohidratos unidas a sus residuos Asn78 y 100. Una actividad particular no ha sido asociada definitivamente con esta región, aunque se cree que pudiera estar involucrada con interacciones proteína-proteína.^{22,24}

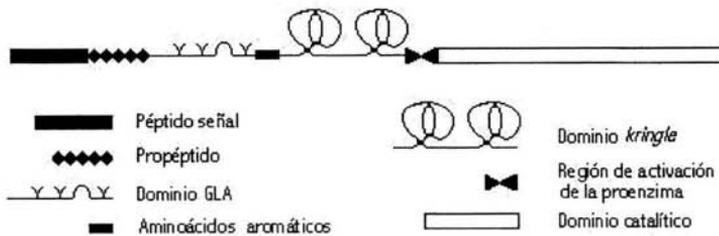


Figura 8. Dominios componentes de la Protrombina.⁹

1.3.3.2. Fragmento 2 de la Protrombina (kringle 2).

El dominio kringle 2 se encuentra en el fragmento 2 de la protrombina. Este dominio es completamente similar al kringle 1 en términos de secuencia, y presumiblemente en términos de estructura también. Este tipo de estructuras fueron primeramente identificadas en la molécula de protrombina y se denominaron kringle. Aunque son idénticas en un 50%, las estructuras kringle funcionan autónoma e independientemente.^{3,22} A diferencia del kringle 1, el kringle 2 tiene varias asignaciones importantes. Este dominio enlaza iones de clacio y parece ser la región primaria de la protrombina que media la interacción de la molécula de protrombina con el factor Va en el complejo de la protrombinasa. La interacción entre el dominio kringle 2 de la protrombina y el factor Va podría ser responsable de la alteración en la conformación de la protrombina, haciendo que los sitios de unión en esta proteína sean más accesibles para el factor Xa, el componente enzimático del complejo de la protrombinasa.^{3,24}

1.3.3.3. Pretrombina 2 y Trombina (Dominio Catalítico).

La pretrombina 2 contiene la secuencia de la enzima trombina. El rompimiento de la pretrombina 2 por el factor Xa en el residuo Arg320 produce como resultado la enzima activa de doble cadena trombina, compuesta por una cadena ligera A de 49 residuos de aminoácidos (residuos 272-320), y una cadena pesada B de 259 residuos (residuos 321-579). Una vez que el sitio activo ha sido generado, la trombina humana actúa sobre su propia cadena A, escindiéndola en Arg284 (Tabla 2) para generar la forma estable de la trombina con una cadena ligera A de 36 residuos de aminoácidos (residuos 285-320).^{3,27} La trombina tiene un peso molecular de 39, 000 Da, aproximadamente la mitad del peso molecular de la protrombina, y las dos cadenas polipeptídicas que la componen se

mantienen unidas por medio de un enlace disulfuro.²² La trombina tiene diferentes efectos en la coagulación a través de la activación de plaquetas, formación de coágulos de fibrina, y activación de varios zimógenos y cofactores en la cascada de coagulación. La trombina activa el factor XIII, la enzima responsable del entrecruzamiento y unión de los monómeros de fibrina para formar el coágulo insoluble de fibrina, y estimula la agregación plaquetaria.

La trombina no solo tiene actividad como procoagulante, sino también como anticoagulante cuando se une a trombomodulina en la superficie de las células endoteliales vasculares y en presencia de proteína S, activa a la proteína C. Las formas activadas de los factores V y VIII son proteolíticamente degradados por la proteína C activada, lo que causa la inhibición del proceso de coagulación. La trombina es quimiotáctica para macrófagos y monocitos. Esta implicada también en la estimulación de la proliferación de células del músculo liso vascular después del daño en un vaso. Los efectos proliferativos de la trombina resultan de la activación directa de vías mitogénicas y/o secreción mediada por trombina, de una variedad de factores de crecimiento. Los procesos involucrados en el desarrollo de aterosclerosis son de igual manera altamente dependientes de la trombina. La trombina incrementa la permeabilidad del endotelio vascular, promueve la adhesión de neutrófilos a las células endoteliales, induce la contracción de células del músculo liso, induce la liberación de serotonina que se encuentra dentro de las plaquetas, y estimula la quimiotaxis de macrófagos.^{3,22}

El dominio en las enzimas de la coagulación sanguínea que muestra homología en su secuencia con la tripsina, se conoce como *dominio catalítico o dominio serinproteasa*. Una característica común de las proteínas que conforman la familia de las serinproteasas es la presencia en el sitio activo de la enzima, de la denominada "tríada catalítica", que se compone de tres residuos de aminoácidos: Histidina, Acido aspártico y Serina. La acción de esta tríada es crítica en el mecanismo de catálisis que llevan a cabo estas enzimas.^{13,25} El dominio catalítico de la protrombina se encuentra dentro de la cadena pesada de la trombina (residuos 321-579), específicamente en los residuos His363, Asp419 y Ser525, que constituyen un sistema regulador de cargas responsable de la actividad proteolítica que lleva a cabo la trombina.²⁴ El dominio catalítico de la molécula de Protrombina también contiene a la tercera cadena de carbohidratos unida al N en el residuo Asn373.^{3,25}

Tabla 2. Sitios de Escisión de la Trombina sobre la Molécula de Protrombina.³

Protrombina humana.	Gln-Val-Thr-Val-Ala-Met-Thr-Pro*-Arg* (155) Glu-Thr-Gln-Thr-Phe-Phe-Asn-Pro*-Arg * (284)
---------------------	---

* La trombina escinde varios substratos macromoleculares, comúnmente después de una secuencia X-Pro-Arg.

1.3.3.4. Meizotrombina.

La meizotrombina es automáticamente escindida o rota en Arg156, liberando al fragmento 1 (dominio GLA y kringle 1) de la molécula y generando meizotrombina menos el fragmento 1 (Figura 7). Subsecuentemente ocurre un autorompimiento en Arg284 que da lugar a una forma estable de trombina humana. La meizotrombina es ahora reconocida como intermediario obligado en la activación de la protrombina, y el primer producto producido por el complejo de la protrombinasa durante la activación de la protrombina. Aunque la meizotrombina es un producto intermediario con un tiempo de vida breve, se piensa que juega una variedad de papeles importantes en la respuesta de coagulación. La meizotrombina está presente aún después de la formación del coágulo de fibrina, y probablemente participa en la regulación del tono vascular, ya que es un agente vasoactivo potente que actúa como receptor adrenérgico. La habilidad que posee la meizotrombina para inducir la constricción vascular es aproximadamente de 5 a 7 veces la producida por la trombina; aunque su actividad sobre el fibrinógeno y las plaquetas es enormemente menor si se compara con ésta. La meizotrombina y la trombina tienen una actividad comparable hacia la proteína C, el factor V, el factor XI y substratos peptídicos pequeños. La meizotrombina cataliza la activación del factor XI por retroalimentación positiva en la vía intrínseca de la coagulación sanguínea y es mejor activadora de la proteína C que la trombina.³

1.4. Gen de la Protrombina Humana.

El gen de la protrombina humana ha sido completamente secuenciado y ampliamente caracterizado. Se compone de aproximadamente 21 kb de DNA²⁵ y ha sido localizado en el cromosoma 11 p11-q12 cercano al centrómero (Figura 9).⁷ La organización del gen de 26, 930 pb consiste en una secuencia de 6, 544 pb corriente arriba del iniciador metionina (extremo 5'), una región codificante de 20, 241 pb que comprende del sitio de iniciación de la transcripción al sitio de

poliadenilación y una secuencia de 145 pb que constituye la región flanqueadora 3' ^{22,24} corriente abajo del sitio de poliadenilación.²²

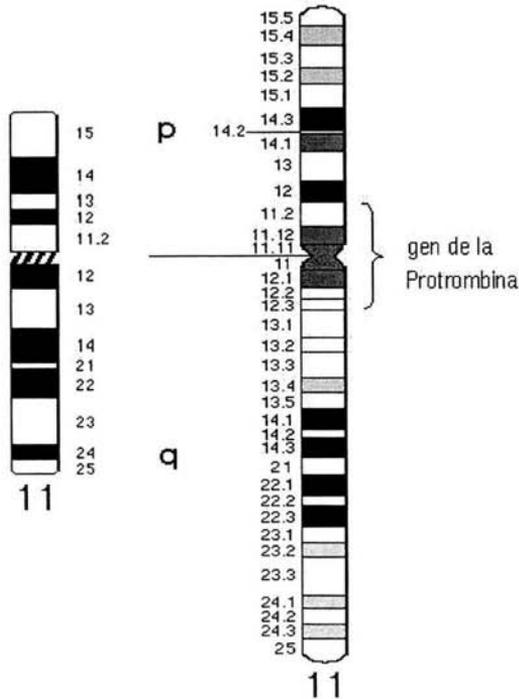


Figura 9. Localización del gen de la Protrombina en el cromosoma 11.²⁸

El gen de la protrombina humana está compuesto por 14 exones, separados por 13 secuencias interventoras o intrones. Los 13 intrones del gen (A a M) varían en tamaño desde 84 hasta 9, 447 pb (Tabla 3), mientras que los exones (I a XIV) varían de 25 a 315 pb, en la porción codificadora y 3' no codificadora del gen (Tabla 4). El tamaño promedio de los exones es de 145 pb. Aproximadamente el 90% del gen de la protrombina es intrón. La distribución de purinas y pirimidinas, calculada desde el iniciador metionina hasta el sitio de poliadenilación incluye: 23.0% A, 25.0% C, 25.6% G y 26.4% T.²⁵

Tabla 3. Localización y Dimensión de Intrones en el Gen de la Protrombina Humana.³

Intron	Tipo ^a	Posición de los nucleótidos	Dimensión pb	No. de repetidos Alu
A	1	80-465	386	–
B	0	627-1285	659	–
C	1	1311-1552	242	–
D	1	1604-3929	2326	4
E	2	4036-4131	96	–
F	1	4269-6606	2338	3
G	1	6922-7245	324	–
H	1	7375-7458	84	–
I	2	7586-8742	1157	2
J	2	8911-9407	497	–
K	2	9582-10123	542	1
L	1	10306-19752	9447	20 ^b
M	0	19824-19969	146	–

^a Tipo 1: Cuando el intron ocurre entre dos codones; Tipo 2: Cuando el intron interrumpe un codon entre la primera y segunda base; Tipo 3: Cuando el intron interrumpe un codon entre la segunda y tercera base.

^b Este intron también contiene dos copias de repetidos parciales “Kpn”.

Tabla 4. Localización y Dimensión de Exones en el Gen de la Protrombina Humana.³

Exon	Posición de los nucleótidos	Dimensión pb	Aminoácidos
I	+1-79	79+*	-43 a -17
II	466-626	161	-17-37
III	1286-1310	25	38-46
IV	1553-1603	51	46-63
V	3930-4035	106	63-98
VI	4132-4268	137	98-144
VII	6607-6921	315	144-249
VIII	7246-7374	129	249-292
IX	7459-7585	127	292-334
X	8743-8910	168	334-390
XI	9408-9581	174	390-448
XII	10124-10305	182	448-509
XIII	19753-19823	71	509-532
XIV	19970-20210	241	533-sitio de poliadenilación

* Las dimensiones de la región 5' no traducida del mRNA para la protrombina humana no se conocen; por tanto, el tamaño del exon I es medido desde el iniciador metionina.

Las secuencias en los puntos de empalme intron-exon, concuerdan con la regla GT-AG y la secuencia consenso típica (Tabla 5),²⁹ excepto por un sitio de empalme; esta secuencia es GCAAGT y se localiza en el extremo 5' del intron L (Tabla 5).^{3,18}

Tabla 5. Secuencias en los Puntos de Empalme Intron/Exon del Gen de la Protrombina Humana.²⁵

Secuencias en los puntos de empalme					
Intron	Exon	5'	Intron	3'	Exon
A	ATG	GTAAGG	- - -	CCACCGCCTTTACAG	T
B	ACG	GTGAGC	- - -	GCCCTTGTTTTTCAG	G
C	CAG	GTGAGC	- - -	CTGGGTCTTTCCAG	C
D	AAG	GTGAGC	- - -	GTGGGGTCTCCGCAG	G
E	TGA	GTGAGT	- - -	AATTCCTCTTCCAG	A
F	GTG	GTAGGC	- - -	CCCCTCACCCACCAG	G
G	GTG	GTGAGC	- - -	CCTGGGTCCCAACAG	A
H	CAG	GTGAGG	- - -	TGGCTTGCTCTGCAG	A
I	TTG	GTGTGT	- - -	TGCTGCCCTCCCAG	G
J	AAG	GTACAG	- - -	TGGGGTCTCTGCAG	G
K	CAG	GTGGGC	- - -	CTTCCTTCCCCAAAG	C
L	CTG	GCAAGT	- - -	CTGTTCTCTTCAAG	G
M	AAG	GTAAGC	- - -	ATCTTCTTCTTCAG	A
Secuencia Consenso*	CAAG	GTAGAGT	- - -	TCTCTCTCTCTCTCTCTCTC TCTCTCTCTCTCTCTCTC	G

1.4.1. Intrones del gen de la protrombina.

El primer intrón (A), que interrumpe la secuencia prepro guía de la protrombina en el residuo Val17, esta cerca del sitio propuesto para el reconocimiento de la peptidasa señal. El segundo intrón (B), se encuentra inmediatamente después del dominio GLA y se localiza entre los residuos Thr37 y Asp38 de la proteína madura. Los intrones A y B separan al dominio GLA en un exón que incluye 17 aminoácidos de la secuencia guía. El tercer intrón (C), se localiza solamente nueve residuos adelante del intrón B, en el residuo Ala46. Los intrones A,B y C están localizados en posiciones análogas a los tres primeros intrones en las regiones codificantes de los genes de los factores VII, IX, X y proteína C. El cuarto intrón (D), del gen de la protrombina se encuentra ubicado justamente antes del primer dominio kringle, en el residuo Gly63. El quinto intrón (E), a diferencia del

cuarto intrón, se sitúa dentro de la secuencia del primer dominio kringle, en el residuo Glu98. El sexto intrón (F), se encuentra localizado inmediatamente después del primer dominio kringle, en el residuo Gly144. El séptimo intrón (G), está ubicado justamente después del segundo dominio kringle, en el residuo Glu249. El segundo dominio kringle no contiene ningún intron, en contraste con el primer dominio kringle de la protrombina y los dominios kringle de otras proteínas estudiadas. El octavo intrón (H), ocurre en la región de la protrombina que se transformará en la cadena ligera de la enzima activa, trombina (residuo Asp292). Los cinco intrones restantes (I, J, K, L, y M), están distribuidos a lo largo de la cadena pesada de la trombina o dominio catalítico de la protrombina. Estos intrones se encuentran ubicados en los residuos Trp334, Arg390, Ser448, Gly509 y entre Lys532 y Ser533 en el dominio catalítico o serinproteasa de la molécula.³

1.4.2. Dominios que codifican los exones del gen de la Protrombina.

El gen de la protrombina tiene 14 exones que codifican para los siguientes dominios (Figura 10): El exón I codifica el prepeptido o péptido señal que dirige a la molécula hacia el RE; el exón II codifica para el propéptido, incluyendo el sitio de reconocimiento para la γ -carboxilación (γ -CRS), y el dominio GLA; el exón III codifica la región altamente hidrofóbica de aminoácidos aromáticos que se encuentra justamente antes de la primer estructura kringle. Los exones I, II y III son homólogos tanto en estructura como en organización, a los correspondientes exones en la familia del factor IX, que incluye al factor IX, factor X, factor VII y proteína C. Los exones IV a VII codifican para las dos regiones kringle; estos dominios no tienen un homología con alguna proteína de la familia del factor IX. Los exones VIII y IX codifican para los sitios donde el factor Xa lleva a cabo la escisión proteolítica que convierte la protrombina a trombina. El dominio catalítico de la trombina, responsable de la catálisis enzimática y de la especificidad por sustrato es codificada por los exones X, XI, XII, XIII y XIV. En la protrombina, los residuos de aminoácidos que conforman la tríada catalítica de las serinproteasas está codificada, cada una, por un exón distinto. La histidina es codificada por el exón X, el ácido aspártico por el exón XI, y la serina por el exón XIII.¹³

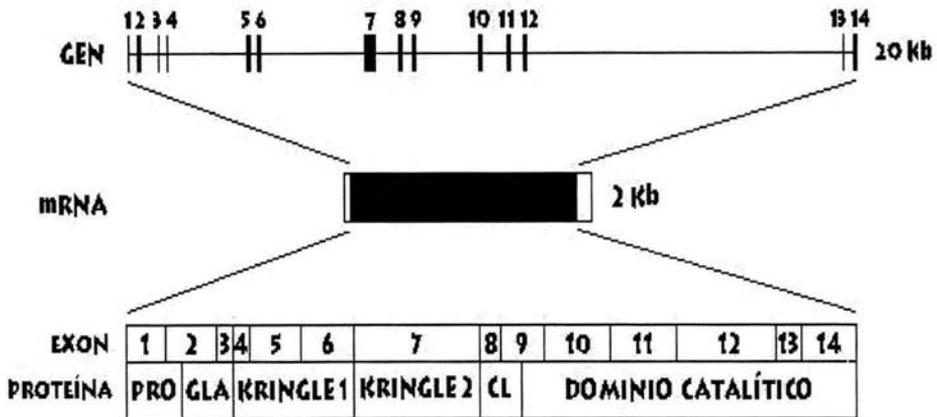


Figura 10. Relación entre la estructura genética y la estructura proteínica de la Protrombina. El mRNA es de 2 kb, con una pequeña región no traducida en 5'- y 3'. En la proteína, PRO indica la secuencia pre-pro guía y LC la cadena ligera o cadena A.²⁴

El mRNA se forma a partir del DNA por el proceso denominado transcripción que es catalizado por la RNA polimerasa dependiente del DNA (RNA polimerasa). La cantidad de una molécula de RNA específica que se transcribe de un gen individual depende, hasta cierto punto, de la secuencia precisa de una región llamada *promotor*, que eslabona la enzima o enzimas que intervienen en la transcripción. La RNA polimerasa tiene una alta afinidad hacia varias secuencias en el DNA de los cromosomas conocidas como promotores, que en la mayoría de los casos se encuentran muy cerca y corriente arriba del punto en que se inicia la transcripción. La secuencia TATA o caja TATA es una característica frecuente, pero de ningún modo universal, y tiene una secuencia consenso TATAAAT. La integridad de esta secuencia es esencial para la función del promotor. La mayoría de las secuencias TATA están flanqueadas por secuencias ricas en GC, que son importantes en la selección del sitio de iniciación de la transcripción.³⁰

La secuencia inmediata que flanquea el extremo 5' del gen de la protrombina, a diferencia de muchos otros promotores no contiene la caja TATA ni la caja CAAT, que típicamente se encuentran a 30 pb (TATA) y 80 pb (CAAT) corriente arriba del sitio de iniciación de la transcripción.^{18,22} Debido a esto, el gen de la protrombina tiene varios sitios potenciales de inicio de la transcripción que se extienden en una región de 3 a 38 pb corriente arriba del iniciador metionina.^{31,32} El sitio encontrado que concuerda mejor con la secuencia consenso para el sitio de inicio de la transcripción se encuentra 31 pb corriente arriba del iniciador metionina y ha sido designado como +1.³¹

La expresión hígado-específica que muestra la protrombina es regulada transcripcionalmente. La actividad del promotor específico de tejido ha sido encontrado en 1,000 pb de los posibles sitios de iniciación de la transcripción. El elemento acentuador "enhancer" hígado-específico se localiza en una región situada entre -940 y -860. Este acentuador (80 pb) contiene un sitio de unión al Factor Hepático Nuclear-1 (HNF-1) flanqueada por una región rica en GC. El HNF-1 es una proteína de unión a DNA que juega un papel en la expresión hígado específica de un número de genes. Este es un ejemplo de factor con actividad trans, una molécula que se une a secuencias de DNA y afecta la expresión del gen asociado.^{22,24}

1.4.3. Secuencias *Alu* en el gen de la protrombina.

Una característica inusual del gen de la protrombina humana es la alta proporción de secuencias repetitivas del tipo *Alu* que contiene en sus intrones, incluyendo la región flanqueadora 5'.^{22,31} Esta familia de secuencias de DNA se compone de aproximadamente 300 nucleótidos (intercalados con el DNA no repetitivo)²⁹ y muestran cerca de un 80% de homología en su secuencia.¹⁸ Por lo menos la mitad del material duplex renaturalizado es escindido por la enzima de restricción *AluI* en un punto único, que se localiza a unos 170 pb a lo largo de la secuencia. La mayor parte de estas secuencias se encuentran flanqueadas por repeticiones directas cortas que ocurren en la misma orientación, pero no adyacentes.²⁹ El gen de la protrombina humana contiene 30 copias de las secuencias repetitivas *Alu*, lo que indica que cerca de un 39 a 41% del gen y secuencia corriente arriba consiste de repetidos *Alu*.^{3,24} El genoma haploide contiene cerca de 350, 000 copias. Esto es el equivalente a una secuencia *Alu* en cada 6 kb de DNA humano. La función de estas secuencias altamente repetitivas, si es que tienen alguna, aún no se conoce. En el gen de la protrombina numerosas secuencias *Alu* están estrechamente agrupadas e incluyen cinco grupos de repetidos en tándem. Como ya se mencionó, las secuencias *Alu* ocurren en grupos o "racimos", 20 de los cuales se encuentran contenidos en la secuencia interventora L (9.5 kb); cinco de estas secuencias repetitivas ocurren de forma continua, es decir, no contienen DNA adicional entre ellos.¹⁸

El gen de la protrombina contiene también dos copias de repetidos parciales *KpnI*, localizados en la secuencia interventora L y varias copias de secuencias moderadamente repetitivas llamadas MERS. Los repetidos parciales *KpnI* tienen un tamaño de 170 pb y 326 pb.²²

1.5. Fisiopatología de la Protrombina.

Previamente a la aparición de la protrombina como un factor de riesgo para el desarrollo de trombosis cuando sus niveles en plasma se encuentran elevados, se hablaba de un riesgo para hemorragias cuando la molécula presentaba niveles bajos o anormalidades.

La deficiencia congénita de la protrombina (factor II) fue reportada de forma preliminar por Quick en 1947, quien posteriormente la describió detalladamente en 1955 y 1962. Dicha condición es uno de los desórdenes congénitos más raros de la coagulación.²⁷

En 1969, Shapiro y col.²⁷ describió la primera anormalidad en la protrombina (Protrombina Cardeza) caracterizada por la discrepancia entre la actividad del factor II, que se encontraba ligeramente disminuida, y el antígeno del factor II, que se encontraba normal. En años posteriores numerosos casos de disprotrombinemia fueron descritos.²⁷

Inicialmente, no se sabía si la hipoprotrombinemia era debida a una "verdadera" deficiencia (o carencia) de moléculas de protrombina o a la presencia de moléculas anormales que carecían de la actividad funcional procoagulante. Hoy en día los defectos congénitos de la protrombina pueden ser clasificados de la manera siguiente. En primer lugar se encuentra la deficiencia "verdadera" de la protrombina, que puede a su vez ser dividida en deficiencias de tipo homocigotas o heterocigotas. En segundo lugar se encuentran las anormalidades de la protrombina, que pueden ser divididas en homocigotos, heterocigotos y doble heterocigotos (aquellos en los que se encuentran asociadas dos anormalidades distintas o una anormalidad y una deficiencia "verdadera").

Cuando se habla de disprotrombinemias, generalmente se refiere a la función defectuosa de uno o más de los dominios que componen a la molécula de protrombina. Por ejemplo, la protrombina San Juan I tiene un defecto que altera la función de del dominio GLA. Esta protrombina muestra anormalidades en la fijación de iones de calcio, mientras que otras muestran tanto el defecto de activación de la protrombina por el factor Xa como defectos adscritos al dominio catalítico. La protrombina Tokushima se caracteriza se caracteriza por la sustitución de un residuo de triptófano por una arginina en la posición 418. La mutación se encuentra inmediatamente después del sitio activo, ácido aspártico, que resulta en una molécula de trombina con actividad reducida sobre el fibrinógeno, y habilidad deficiente para inducir la agregación plaquetaria.

Las protrombinas Molise y Metz también se encuentran presentes dentro del dominio catalítico, resultando en la producción de moléculas defectuosas de trombina. La activación de la protrombina

por el factor Xa es normal, pero la trombina que se genera es incapaz de escindir al fibrinógeno.^{24,27} En la Tabla 6 se muestran las principales variantes de la protrombina que han sido descubiertas.³

Tabla 6. Variantes de la Protrombina Humana.

Variante^{3,27}	Año²⁷	Defecto funcional o molecular³
Barcelona	1971	Arg273 → Cys
Brussels	1974	Desconocida
Cardeza	1969	Proteólisis alterada del factor Xa
Clamart	1985	Proteólisis alterada del factor Xa
Denver	1980	Desconocida
Gainesville	1981	Desconocida
Habana	1983	Desconocida
Himi I	1991	Met337→ Thr
Houston	1980	Desconocida
Madrid/Olifiro		
Padua	1974	Arg271→ Cys
Magdeburg	1989	Desconocida
Metz	1982	Sitio activo de trombina defectuoso
Poissy	1987	Activación anormal por el factor Xa
Quick I	1947	Arg382→ Cys
Quick II	1955	Gly558→ Val
Salatka/Frankfurt	1984	Glu466→ Ala
San Juan	1974	Defecto en la fijación de calcio
Segovia	1986	Posible defecto en el fragmento 2
Molise/Tokushima	1978	Arg418→ Tyr

1.6. Mutación G20210A.

1.6.1. Trombofilias hereditarias y mutación G20210A.

Las funciones del sistema hemostático consisten en evitar la pérdida de sangre en los vasos sanguíneos intactos y minimizar la cantidad perdida en caso de una lesión con rotura. Las deficiencias de cualquiera de las proteínas procoagulantes altera el equilibrio entre la coagulación y la lisis, produciendo hemorragia excesiva. Una segunda manifestación anormal de la hemostasia es la trombosis, que es una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad entre los pacientes hospitalizados.³³

Se produce trombosis cuando el sistema hemostático se activa de manera inapropiada al grado de que los procesos anticoagulantes naturales se superan y se permite la formación de un coágulo dentro de un vaso sanguíneo intacto.³⁴ El coágulo que impide el paso normal de la sangre se conoce como trombo y está constituido por una masa de fibrina, plaquetas y células atrapadas. Al crecer, esta masa o trombo puede ocluir el vaso sanguíneo y producir entonces la muerte de los tejidos abastecidos normalmente por ese vaso. Además, una vez que se ha generado el coágulo, es probable que el flujo de la sangre continuo más allá del coágulo, lo desprenda de su unión y lo arrastre consigo; estos coágulos que fluyen libremente se denominan *émbolos*.¹⁰ Dicho émbolo puede desplazarse hacia ramas vasculares más pequeñas, y puede alojarse en un vaso menor a su tamaño, obstruir el flujo sanguíneo y causar subsecuentemente la destrucción del tejido. A esta obstrucción se le llama embolia o tromboembolia.¹ La enfermedad tromboembólica puede ser clasificada a grandes rasgos como aquella que ocurre en el sistema venoso de baja presión y flujo, o en el sistema arterial de alta presión y flujo.³³ Los trombos también se pueden formar en capilares en donde se observan ya sea en áreas localizadas o distribuidos difusamente a lo largo de áreas extensas del cuerpo.

Hay múltiples padecimientos que conducen a un desequilibrio entre la promoción del desarrollo de coágulos y los factores que los inhiben, y debe considerarse que predisponen a la trombosis. Hace cerca de 150 años, Virchow postuló que la trombosis es causada por tres factores principales (tríada de Virchow); estos comprenden lesiones morfológicas o funcionales de la pared de los vasos sanguíneos (endotelio), modificaciones en las características del flujo de sangre (estasis) y anormalidades de los componentes de la sangre (principalmente plaquetas y diversas proteínas)³⁵ Este concepto creó el fundamento para la investigación subsecuente de los estados de hipercoagulabilidad.³⁵

Un estado hipercoagulable se produce cuando la activación del mecanismo hemostático sobrepasa la capacidad inhibitoria fisiológica, lo que resulta en aumento de la generación intravascular de trombina que va a favorecer la aparición de trombosis.³⁶

La trombofilia biológica se define como una condición caracterizada por defectos o anomalías, congénitas o adquiridas, de diversos componentes del mecanismo hemostático que van a favorecer la formación, aparición o persistencia de un trombo.³⁷ Se han identificado diversas alteraciones hereditarias que afectan generalmente a un solo factor de la coagulación o de la fibrinólisis y que producen el defecto o disfunción de alguna de las proteínas involucradas en estos sistemas. Así mismo, hay alteraciones adquiridas asociadas con un aumento del riesgo trombótico, arterial o venoso y otros factores en los cuales influencias externas pueden actuar sobre variaciones genéticas no determinantes (Tabla 7).³⁸

Las influencias del medio ambiente, ya sean transitorias o duraderas tienen un papel importante en la perturbación de la hemostasia e influyen el riesgo de trombosis. El término *medio ambiente* es usado en el sentido más amplio que comprende cambios inducidos por diversas influencias como parto, ingestión de hormonas, cirugía, dieta y el hábito de fumar; por desórdenes intercurrentes como diabetes mellitus, hipertensión y dislipidemia, hiperhomocistinemia, y por cambios locales en la pared vascular. La alteración de la hemostasia puede ser en parte determinada genéticamente, y cuando este es el caso, su influencia es potencialmente crítica debido a que permanece durante el tiempo de vida. Es poco probable que los cambios genéticos puedan ser, por sí solos el único determinante de las trombosis, lo cual pone de manifiesto la importancia de las interacciones gen-medio ambiente en el desarrollo de la enfermedad.^{33,39}

En general, los pacientes con desórdenes hereditarios tienden a presentar manifestaciones de la enfermedad a una edad temprana, tienen grupos familiares con trombosis y exhiben una tendencia a eventos recurrentes. Reportes de investigaciones en esta área han descrito incluso trombosis que ocurren en sitios atípicos, como la vena mesentérica o vena cerebral que ha sido atribuido a predisposición genética.²¹

Desde los años 60 numerosos desórdenes genéticos que contribuyen a la trombosis han sido caracterizados (Tabla 7). En 1965 Egeberg describió la primera de estas anomalías genéticas, la deficiencia de antitrombina, el inhibidor más importante de la cascada de coagulación que actúa principalmente sobre la trombina, regulando de esta manera la formación del coágulo.²¹ En 1981 la deficiencia hereditaria de proteína C fue descrita por Griffin et al. Posteriormente la deficiencia hereditaria de proteína S asociada con enfermedad tromboembólica fue descrita por dos grupos en 1984. Estos tres desórdenes son heredados de forma autosómica dominante. Al igual que estos defectos existen numerosas anomalías genéticas que son extremadamente infrecuentes o no han sido bien establecidas.²¹

Tabla 7. Alteraciones Trombofílicas Hereditarias.²¹

Establecida	Extremadamente infrecuentes	Recientemente descritas
Deficiencia de Antitrombina	Disfibrinogenemia	Hiperhomocistinemia
Deficiencia de Proteína C	Deficiencia de Trombomodulina	Factor V Leiden
Deficiencia de Proteína S	Deficiencia de Cofactor II de la Heparina	Protrombina G20210A

La importancia de los factores genéticos es demostrada por el hecho de que en 20% a 40% de los pacientes existen antecedentes familiares de la enfermedad. Durante los últimos años se han identificado varios factores genéticos que predisponen a la trombosis (Tabla 8), sin embargo hasta el momento sólo dos de ellos tienen una alta prevalencia; el Factor V Leiden,⁴⁰ que es la causa más común de trombofilia hereditaria, y la Protrombina G20210A.⁴¹

Tabla 8. Prevalencia de Factores de Riesgo Hereditarios para Trombosis.²¹

Factor de Riesgo	Prevalencia en la población general (%)	Prevalencia en pacientes con TVP* (%)	Riesgo Relativo
Factor V Leiden	5	20	7
<i>Protrombina G20210A</i>	2	6	3
Deficiencia de proteína C	0.2-0.4	3	7
Deficiencia de proteína S	0.7	2	10
Deficiencia de Antitrombina	0.02	1	5
Homocistinuria	1:335,000	<0.1	2.5

* Trombosis Venosa Profunda

En 1996, por medio de secuenciación de las regiones codificadoras y flanqueadoras del gen de la protrombina, Poort et al.,⁸ describió por primera vez la mutación G20210A en este gen. Dicha mutación está localizada en la región 3' no codificante (3'UTR) de la secuencia de este gen y consiste

en la transición del nucleótido G por el nucleótido A en la posición 20210 (Figura 11). El estudio inicial fue realizado sobre 28 individuos pertenecientes a familias con historia de trombosis de repetición. Poort et al.,⁸ encontró la mutación de la protrombina G20210A en 18% de los pacientes seleccionados (5 de 28), pero solamente en el 1% de los individuos pertenecientes al grupo control. De esta manera Poort et al.,⁸ demostró que aquellos individuos portadores del polimorfismo G20210A poseen un riesgo de trombosis incrementado 2.8 veces con respecto a aquellos individuos no portadores. Estudios posteriores han encontrado incrementos en el riesgo de entre dos y seis veces en portadores con respecto a los no portadores.^{42,43}

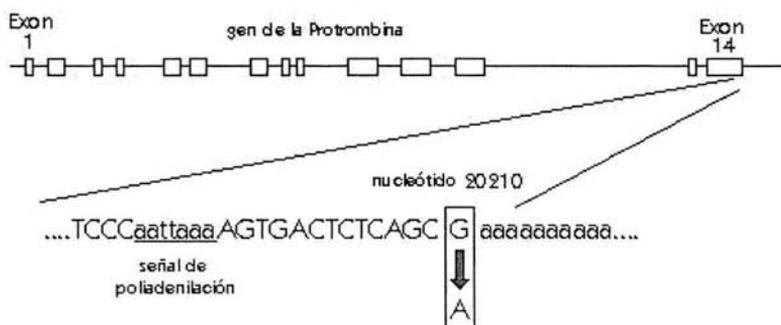


Figura 11. Localización de la mutación G20210A en el gen de la Protrombina. La variante se encuentra en la porción terminal del exón 14. Esta porción no contribuye a la secuencia codificante y que contiene a la región llamada 3' no traducida.³

En un estudio subsecuente poblacional de casos y controles, Poort et al.,⁸ mostraron que 6.2% de 471 pacientes consecutivos no seleccionados con un primer episodio confirmado de trombosis venosa profunda, portaban el alelo G20210A de la protrombina, comparado con 2.3% de 474 sujetos control pareados por edad y sexo. Estos investigadores también estudiaron los niveles de actividad de protrombina y encontraron que aquellos individuos con el genotipo normal (20210 G/G) tenían un nivel medio de protrombina en plasma de 1.05 U/ml mientras que los individuos con una copia de la transición 20210G→A tenían un nivel medio de protrombina en plasma de 1.32 U/ml; esto representa una elevación de casi 26% con respecto a los no portadores del alelo. Dado que la elevación de los niveles de protrombina constituye por sí misma un factor de riesgo para trombosis venosa, se ha atribuido a esta razón su asociación con el alelo G20210A del gen de la protrombina.⁴⁴ No obstante, el mecanismo específico por el cual la mutación incrementa los niveles de la proteína en plasma aun no se conoce.⁸

Numerosos estudios alrededor del mundo han corroborado la relación entre los niveles plasmáticos de protrombina y la presencia de la mutación G20210A en el gen que la codifica.⁴⁵ En 2000, Soria JM,⁴⁶ llevó a cabo el primer estudio familiar para medir el efecto de esta variación genética, mostrando que la presencia de este alelo tiene influencia sobre los niveles plasmáticos de protrombina y por tanto sobre el riesgo de trombosis. En un estudio posterior se encontró, por medio de secuenciación de la región promotora del gen de la protrombina (1 kb), que no existen variaciones adicionales a la mutación G20210A que pudieran estar involucradas con el aumento en los niveles de esta proteína en plasma.⁴⁷

Con respecto al riesgo de trombosis venosa asociado con el alelo G20210A, se ha encontrado que aquellas mujeres con una copia de dicho alelo que además usan anticonceptivos orales – que por sí mismas representan un incremento de 6 veces en el riesgo de trombosis venosa – presentan un incremento de 16 veces en el riesgo de padecer esta enfermedad, en comparación a aquellas mujeres que no portan el alelo y que no usan anticonceptivos orales.⁴³

La mutación en el gen de la protrombina también se asocia con trombosis venosa cerebral, reportada en 20% de los pacientes que la padecen contra 3% en sujetos control.⁴⁸ En 1998, Reuner, et al.,⁴⁹ estudiando pacientes con trombosis venosa cerebral, encontró que la mutación mencionada se encuentra asociada con el desarrollo de esta enfermedad; no así para evento vascular cerebral isquémico o ataque isquémico transitorio.^{49,50}

Algunos estudios han mostrado que la variante G20210A es un factor de riesgo para la enfermedad coronaria, aunque solo en presencia de otro factor de riesgo,⁵¹ mientras que otros han concluido que dicha asociación no existe.⁵² Uno de los primeros en investigar el papel de esta mutación fue Rosendaal et al. (1997),⁵³ estudiando mujeres en edades de entre 18 y 44 años con enfermedad coronaria comparó la variante G20210A en un grupo de 79 mujeres con infarto de miocardio contra 381 controles y encontró que el riesgo no variaba considerablemente entre ambos grupos; sin embargo, cuando la mutación estaba presente en adición a factores de riesgo adquiridos el riesgo se incrementaba de 9 a 43 veces en mujeres fumadoras, y de 5 a 34 veces en mujeres que presentaban otros factores de riesgo metabólicos. De modo similar, en un estudio con una población consistente en 560 hombres con un primer episodio de infarto de miocardio antes de los 70 años y 646 hombres como controles, Doggen, et al. (1998),⁵⁴ mostró que, en presencia de factores de riesgo adicionales, la presencia de la mutación en la protrombina causa un efecto sinérgico en el riesgo de infarto de miocardio. No obstante, se han reportado estudios en los que no existe una clara relación entre esta mutación y la enfermedad coronaria.^{55, 56, 57}

El número de individuos homocigotos descritos hasta el momento aun es muy reducido.^{8, 52, 56, 58, 59, 60, 61, 62} Poort, et al.,⁸ describió a una paciente de una familia de 24 miembros con síntomas

trombóticos que mostraba el genotipo homocigoto. No obstante, esta paciente era también heterocigota para el factor V Leiden. En una investigación realizada por De Stefano se encontraron dos individuos homocigotos de entre 72 pacientes jóvenes con evento vascular cerebral isquémico (2.8%). Uno era un hombre de 24 años de edad y el segundo de 26 años. Esto sugiere una importante relación entre la homocigocidad y el desarrollo de la enfermedad a una edad temprana. En contraste, un reporte de cinco individuos con la variante G20210A en una familia de tres generaciones mostró que el estado homocigoto no confería un riesgo elevado de trombosis.⁶²

La variante alélica G20210A del gen de la protrombina se ha encontrado generalmente asociada a la mutación del factor V Leiden.^{59, 63} En el estudio original realizado por Poort, de los 5 pacientes portadores del alelo G20210A, 2 (40%) eran también portadores de la mutación del factor V Leiden, lo cual sugiere un incremento en la frecuencia de cosegregación de heterocigocidad para estas dos variantes genéticas en familias con trombofilia hereditaria. Makris,⁶³ comparó la prevalencia del alelo G20210A en 101 sujetos no emparentados con historia de trombosis venosa para establecer si la herencia adicional de dicho alelo estaba asociada con incremento en el riesgo para la enfermedad. Estos investigadores encontraron que el 5% de los pacientes portaban ambas mutaciones. Adicionalmente se reportó que el riesgo de trombosis venosa recurrente aumentaba considerablemente cuando las mutaciones en los dos genes se encontraban presentes.⁶⁴ Al igual que otros defectos genéticos asociados con trombofilia, la variante G20210A usualmente necesita la presencia de factores de riesgo adicionales, ya sean adquiridos o hereditarios para manifestar la enfermedad. No obstante, analizar la contribución de cada factor es difícil debido al hecho de que la trombofilia es un desorden multifactorial.²¹

Como se ha podido observar en los estudios anteriormente mencionados, para poder establecer la importancia de un determinante genético como factor de riesgo para el desarrollo de una enfermedad o padecimiento definido, es importante correlacionar los datos encontrados en los pacientes afectados, con los datos encontrados para la población general o normal; es por ello que alrededor del mundo se comenzaron a desarrollar numerosos estudios para conocer la frecuencia de la mutación G20210A del gen de la protrombina en la población aparentemente normal, que no hubiera padecido o mostrado sintomatología de alguna enfermedad de tipo vascular.

Estos estudios poblacionales realizados encontraron gran diversidad de frecuencias entre las distintas razas analizadas, algunos de estos resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Frecuencias de la mutación G20210A reportadas.

PAIS	HETEROCIGOTOS	TOTAL	PROPORCION
Holanda ⁵⁴	8	646	1.2%
Suecia ⁶⁵	3	207	1.4%
Reino Unido ⁶⁶	14	498	2.8%
Portugal ⁶⁷	5	100	5.0%
Francia ⁶⁸	4	400	1.0%
Italia ⁶¹	39	850	4.6%
Turquía ²¹	6	100	6.0%
Grecia ²¹	4	100	4.0%
Islandia ⁶⁹	1	108	1.0%
Judíos ⁷⁰	63	1670	3.8%
España ^{60,71,72}	40	875	4.5%
Africa ²¹	3	697	0.4%
Asia ²¹	1	773	0.1%

De manera general se ha establecido un promedio de entre 1 y 4% para la frecuencia de la mutación G20210A entre la población normal⁷³, encontrando las frecuencias más bajas en las poblaciones Africana y Asiática (0.43%)²¹, y una frecuencia alta en población judía Europea Ashkenazi (6.7%)⁷⁰, que es de hecho la frecuencia más elevada reportada hasta el momento entre los estudios de poblaciones.

El diagnóstico de laboratorio para demostrar la presencia del alelo G20210A del gen de la protrombina está basado únicamente en el análisis del DNA. Esta mutación es el primer ejemplo de un defecto genético de la coagulación que no puede ser diagnosticado por pruebas funcionales o inmunológicas. La detección de esta variante alélica se realiza mediante técnicas de genética molecular, las cuales se basan en la amplificación del DNA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), seguida por digestión enzimática del fragmento amplificado (PCR-RFLP).⁴¹

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General.

- Determinar la frecuencia de la mutación G20210A del gen de la protrombina en una muestra de la población mexicana aparentemente normal con antecedentes de mestizaje.

2.2. Objetivos Particulares.

- Determinar la presencia de la mutación G20210A en un grupo de la población mexicana por medio del análisis de DNA
- Comparar la frecuencia obtenida para este grupo de población mexicana con la reportada en otros países.
- Obtener resultados que en un estudio posterior puedan ser comparados con frecuencias obtenidas para pacientes de trombosis venosa, de modo que se establezca si la mutación G20210A es un factor de riesgo para estos pacientes.

3. HIPOTESIS

- Considerando el hecho de que la población mexicana es una mezcla heterogénea de diversas poblaciones, y que a lo largo de las generaciones se han ido diversificando dichas mezclas, la frecuencia de la mutación G20210A del gen de la Protrombina no será muy parecida a la población asiática.
- Tomando en cuenta la baja recurrencia de homocigotos para la mutación G20210A, ésta condición no estará presente en nuestra muestra.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. *Material.*

4.1.1. Químico.

- = Buffer de lisis de glóbulos rojos (RCLB)
- = Hipoclorito.
- = NaCl
- = SDS
- = Fenol Saturado.
- = Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico.
- = Cloroformo-Alcohol isoamílico.
- = Isopropanol.
- = Etanol absoluto.
- = Buffer de lisis de glóbulos blancos (WCLB)
- = H₂O inyectable.
- = H₂O desionizada estéril.
- = Agarosa.
- = TBE 10X
- = Bromuro de etidio.
- = Colorante III
- = Enzima de restricción.

4.1.2. Biológico.

Para el análisis de la variante G20210A en el gen de la protrombina se estudiará una muestra total de 466 individuos.

4.1.2.1. Criterios de inclusión y exclusión.

La muestra consistirá en hombres y mujeres aparentemente sanos los cuales normalmente acuden como donadores al banco de Sangre del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", provenientes del DF y varios estados de la República Mexicana. Todos los individuos deberán ser hijos de padres mexicanos y con al menos un abuelo español. Cada uno de los individuos debe cumplir con los requisitos indispensables para realizar donación de sangre.

4.1.3. Equipo.

- = Agitador vortex.
- = Balanza analítica SHIMADZU.
- = Baño maría con agitación Cole Parmer.
- = Bomba de vacío.
- = Cámara de electroforesis horizontal.
- = Centrifuga 5415C Eppendorf.

- = Equipo fotográfico POLAROID DS 34
- = Espectrofotómetro DU-40 BECKMAN.
- = Fuente de poder 500 BRL.
- = Microcentrifugas SORVALL MC 12V.
- = pH metro BECKMAN
- = Termociclador DNA PERKIN ELMER.
- = Transiluminador de luz UV Cole Parmer.
- = Ultracentrifuga SORVALL RC 28S.

- = Tubos Falcon de 50ml.
- = Tubos eppendorf de 1.5ml y 0.5ml.
- = Tubos de ensayo.
- = Jeringas de 20ml.
- = Pipetas Pasteur.
- = Pipetas de transferencia.
- = Puntas para micropipetas.
- = Filtro con membrana de 0.22 μ m.
- = Pinzas para filtro.
- = Gasas.
- = Gradillas.
- = Pizetas.
- = Mechero.

4.2. Métodos.

4.2.1. Obtención de la muestra.

Inicialmente se toma una pequeña muestra de sangre a cada donador para realizar un análisis que permita saber si se encuentra apto para realizar la donación. Posteriormente se recibe la sangre en una bolsa recolectora triple, específicamente en la bolsa madre, que contiene 63 ml de anticoagulante SPD (Citrate de sodio, Dextrosa y Ácido cítrico), para un volumen final de 500 ml. Esta bolsa recolectora triple se centrifuga a 4000 rpm durante 10min. para separar los componentes de la sangre. Una vez realizada la centrifugación y con ayuda de un fraccionador se obtiene el plasma en la segunda bolsa recolectora y el concentrado eritrocitario en la tercera. Esta última contiene un conservador que ayuda a mantener el concentrado eritrocitario en condiciones adecuadas por un período de 42 días almacenado a una temperatura de entre 1 y 6°C.

4.2.2. Extracción de DNA.

El DNA genómico se obtiene a partir del concentrado eritrocitario, más específicamente de los leucocitos que contiene dicho concentrado. La extracción se lleva a cabo tanto por la técnica de sales,⁷⁴ como por el método de Proteinasa K⁷⁴; ambos procedimientos se basan en el rompimiento de

las membranas celulares de modo que estas liberen el DNA. El DNA que se obtiene por cualquiera de las técnicas mencionadas aún esta contaminado con proteínas y restos celulares, por lo que se realizan extracciones con fenol saturado para eliminarlas. Posteriormente la extracción con fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico elimina los restos de fenol saturado, y por último la extracción con cloroformo-alcohol isoamílico elimina los restos de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. El DNA así obtenido se precipita, ya sea con isopropanol o etanol absoluto, se lava con etanol al 70% y se disuelve en agua inyectable.⁷⁴

Lisis de Glóbulos Rojos

- 1 Llenar un tubo Falcon con aproximadamente 15ml de la muestra sanguínea.
- 2 Agregar RCLB hasta 45ml
- 3 Equilibrar los tubos y agitar por 10min.
- 4 Centrifugar a 5000rpm y 4°C por 10min.
- 5 Con una bomba de vacío, desechar el sobrenadante hasta aproximadamente la mitad del tubo.
- 6 Repetir los pasos 2 a 5 hasta que se observe el botón de leucos lo más limpio posible.
- 7 Desechar todo el sobrenadante y almacenar la muestra en congelación.

Extracción de DNA por el método de sales

- 1 Al botón de glóbulos blancos se agregan 886µl de NaCl 5mM, 46µl de SDS al 10% y 308µl de NaCl saturado 7M.
- 2 Desprender el botón y homogeneizar suavemente con ayuda de una pipeta de transferencia.
- 3 Transferir el contenido de cada tubo Falcon a 2 tubos eppendorf de 1.5ml
- 4 Agregar fenol saturado a cada tubo eppendorf hasta aproximadamente 1.5ml
- 5 Homogeneizar muy lentamente con movimientos semicirculares.
- 6 Centrifugar a 11000rpm y 4°C por 10min.
- 7 Transferir el sobrenadante obtenido a tubos nuevos eppendorf y agregar una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.
- 8 Homogeneizar muy lentamente con movimientos semicirculares.
- 9 Centrifugar a 11000rpm y 4°C por 10min.
- 10 Transferir el sobrenadante obtenido a tubos nuevos eppendorf y agregar una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico.
- 11 Homogeneizar muy lentamente con movimientos semicirculares.
- 12 Centrifugar a 11000rpm y 4°C por 10min.
- 13 Transferir el sobrenadante obtenido a tubos nuevos eppendorf y agregar isopropanol frío.

- 14 Homogeneizar muy suavemente hasta la precipitación del DNA.
- 15 Almacenar las muestras en refrigeración para favorecer la precipitación del DNA.

Lavado del DNA

- 1 Centrifugar las muestras extraídas a 11000rpm y 4°C por 10min.
- 2 Decantar el sobrenadante.
- 3 Agregar etanol al 70% y agitar para desprender el botón.
- 4 Centrifugar a 11000rpm y 4°C por 10min.
- 5 Realizar dos lavados más con etanol 70% y en el último decantar todo el sobrenadante y secar el DNA en una centrifuga con vacío.
- 6 Agregar aproximadamente 500µl de agua inyectable a cada tubo para disolver el DNA (la cantidad de agua varía dependiendo la cantidad de DNA obtenido).
- 7 Dejar disolviendo el DNA en baño maría a 50°C toda la noche o un mínimo de 2hrs.

Extracción de DNA por el método de Proteinasa K

- 1 Inmediatamente después de haber realizado la lisis de glóbulos rojos, se agrega 1ml de RCLB a cada muestra hasta desprender el botón de glóbulos blancos cuidadosamente.
- 2 Con ayuda de pinzas, ajustar un filtro con membrana de 0.22µm
- 3 Cargar una jeringa con WCLB
- 4 Atornillar la jeringa al filtro y agregar 5ml de WCLB a cada tubo.
- 5 Incubar las muestras en baño maría a 42°C y agitación suave durante toda la noche o un mínimo de 3hrs.
- 6 Agregar a cada muestra fenol saturado, volumen a volumen.
- 7 Agitar muy suavemente por 10min.
- 8 Centrifugar a 5000rpm y 4°C por 10min.
- 9 Transferir la fase superior obtenida a un nuevo tubo Falcon y agregar una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, volumen a volumen.
- 10 Agitar muy suavemente por 10min.
- 11 Centrifugar a 5000rpm y 4°C por 10min.
- 12 Transferir la fase superior obtenida a un nuevo tubo Falcon y agregar una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico, volumen a volumen.
- 13 Agitar muy suavemente por 10min.
- 14 Centrifugar a 5000rpm y 4°C por 10min.

- 15 Transferir la fase superior obtenida a un nuevo tubo Falcon y agregar 72 μ l de NaCl 5M y etanol concentrado frío hasta aproximadamente 35ml.
- 16 Agitar muy suavemente las muestras hasta precipitación del DNA
- 17 Almacenar en congelación de 20 a 30min. para favorecer la precipitación.

Lavado del DNA

- 1 Calentar las puntas de pipetas Pasteur para darles forma de gancho.
- 2 Enroscar el DNA en el gancho de la pipeta y lavar en un tubo de ensayo conteniendo etanol al 70% y sumergiéndolo repetidamente.
- 3 Secar el DNA a temperatura ambiente en el gancho de la pipeta.
- 4 Una vez seco, agregar aproximadamente 500 μ l de agua inyectable a cada tubo para disolver el DNA (la cantidad de agua varía dependiendo la cantidad de DNA obtenido).
- 5 Dejar disolviendo el DNA en baño maría a 50°C toda la noche o un mínimo de 2hrs.

4.2.3. Cuantificación de DNA.

Una vez disuelto el DNA se realiza una cuantificación por medio de espectrofotometría UV. Las proteínas absorben la luz ultravioleta en un espectro distinto al de los ácidos nucleicos; de esta manera se puede conocer tanto la cantidad de DNA que se obtuvo, como la pureza del mismo. La absorbancia de las proteínas se lee a 280 nm, mientras que la de los ácidos nucleicos se lee a 260 nm.

Cuantificación de DNA⁷⁴

- 1 Preparar alícuotas con 5 μ l de DNA previamente disuelto en agua y 495 μ l de agua inyectable.
- 2 Agitar en vortex.
- 3 Realizar lectura de absorbancias en espectrofotómetro UV a 260 y 280nm, utilizando como blanco agua inyectable.
- 4 Realizar los cálculos correspondientes para la cuantificación:

$$[\text{DNA ng}/\mu\text{l}] = [\text{Abs } 260\text{nm}] (\text{densidad óptica}) (\text{dilución})$$

- 5 Realizar los cálculos para conocer la pureza del DNA obtenido:

Abs 260 / Abs 280 = pureza del DNA (debe encontrarse aproximadamente entre 1.9 y 2.0)

Para conocer la calidad del DNA obtenido, este es analizado cualitativamente por medio de electroforesis en gel de agarosa, que se realiza de la manera siguiente:

- 1 Preparar agarosa al 1% (disuelta en TBE 1X) y calentar hasta ebullición.
- 2 Llenar la cámara de electroforesis con la agarosa y colocar el peine para formar los pozos.
- 3 La agarosa debe gelificar en aproximadamente 10min. para después agregar TBE 1X suficiente para cubrirla.
- 4 Cargar cada uno de los pozos con una mezcla que contenga 2 μ l de colorante CCIII y 3 μ l de muestra de DNA.
- 5 Cerrar la cámara y conectar los electrodos a la fuente de poder y a la cámara de electroforesis.
- 6 Ajustar la corriente a 100 V
- 7 Una vez que termine el corrimiento de las muestras a través del gel, éste se retira para ser introducido en bromuro de etidio por aproximadamente 1min.
- 8 Retirar y enjuagar con agua por 5min.
- 9 Observar en transluminador de luz UV y tomar una fotografía de ser necesario.

4.2.4. Amplificación de DNA mediante PCR.

La amplificación del DNA se refiere a la producción de copias adicionales de una secuencia cromosómica de DNA, y se lleva a cabo por medio de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Figura 12), que describe una técnica en la que por medio de 3 ciclos básicos se amplifica el número de copias de una secuencia diana de DNA.^{29, 75}

Para llevar a cabo la técnica de PCR se requiere de cuatro componentes principales: DNA genómico que contiene la secuencia blanco; un par de cebadores (primers, secuencias de nucleótidos de aproximadamente 20 pb que son complementarios a la secuencia que flanquea la región que se desea amplificar); los cuatro deoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); y una DNA polimerasa estable al calor.⁷⁶ Un ciclo de PCR consta de tres etapas (Figura 12):

- 1 *Separación de las hebras o desnaturalización.* La doble cadena de DNA se separa en dos hebras por medio de calentamiento a 94°C.

- 2 *Alineación*. Los primers se hibridan o alinean con sus bases complementarias en las hebras de DNA genómico a una temperatura que generalmente se encuentra entre los 50 y 60°C.
- 3 *Extensión o elongación*. Comprende la extensión de los primers en dirección 5' y 3' a lo largo de la cadena de DNA blanco por la DNA polimerasa. Este paso se lleva a cabo a 72°C.

Los fragmentos recién sintetizados sirven a su vez como plantillas para la amplificación. Usualmente estos ciclos se repiten por 30 ciclos o más, de modo que al cabo de n ciclos la secuencia blanco se habrá amplificado 2^n veces.²⁰

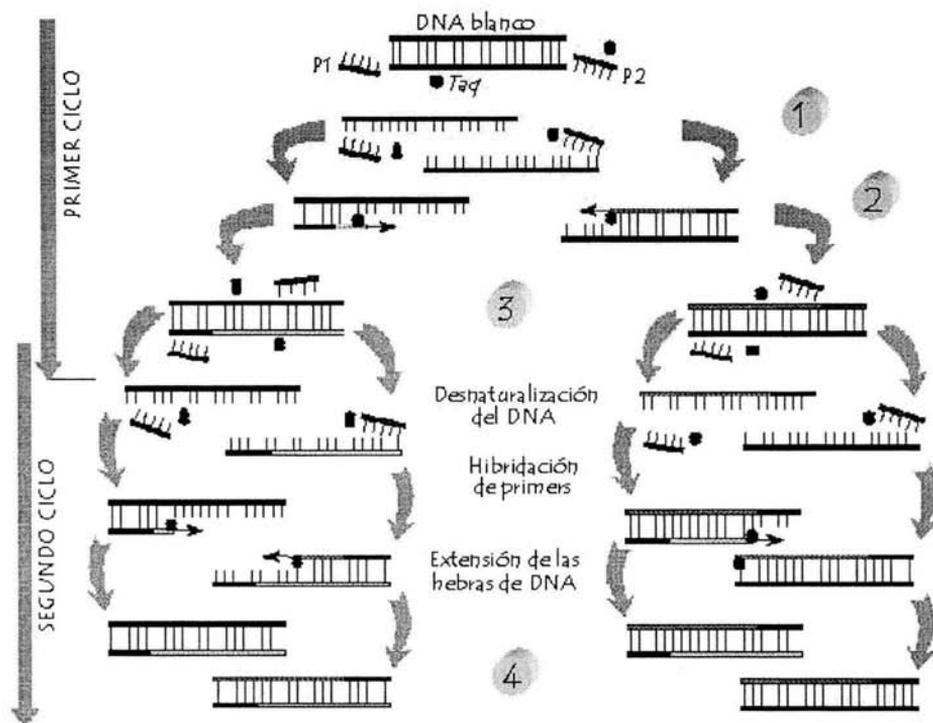


Figura 12. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). 1) Desnaturalización de las cadenas de DNA genómico y alineación de los primers P1 y P2; 2) Extensión de las hebras por la Taq polimerasa; 3) En el primer ciclo de síntesis se obtienen dos copias de la secuencia del DNA blanco; 4) En el segundo ciclo se obtienen cuatro copias.⁶⁸

Para la detección de la variante G20210A del gen de la protrombina se lleva a cabo la amplificación por PCR de un fragmento de la región 3' no traducida de este gen. Los primers utilizados se diseñan por medio de mutagénesis dirigida para generar productos de PCR que sean

susceptibles a la endonucleasa de restricción Taq I.³⁰ Para ello se emplea un primer mutagénico (PTH-1), que muestra una sustitución en un nucleótido (subrayado): 5' CAATAAAAGTGACTCTCATC 3' (20190-20209) y un segundo primer PTH 2: 5' AGGTGGTGGATTCTTAAGTC 3' (20307-20288). El producto de PCR que se obtiene de esta forma es un fragmento de 118 pb.⁶⁹

PCR

- 1 Preparar buffer de reacción necesario, dependiendo la cantidad de muestras.

Buffer para preparar 1 reacción:

2.5µl	PRIMER PTH-1 (100ng/µl)
3µl	PRIMER PTH-2 (100ng/µl)
1.5µl	BUFFER 10X
0.15µl	ENZIMA (Taq-Polimerasa 5U/µl)
0.36µl	dATP (10mM)
0.36µl	dGTP (10mM)
0.36µl	dCTP (10mM)
0.36µl	dTTP (10mM)
2.41µl	H ₂ O inyectable

- 2 Mezclar todos los reactivos en un tubo.
- 3 Agregar 11µl de buffer de reacción a cada tubo eppendorf de 500µl
- 4 Añadir 4µl de muestra de DNA (100ng/µl) a cada tubo, de modo que se obtengan 15µl de reacción totales.
- 5 Agregar 6.5µl de aceite mineral a cada muestra si el termociclador lo requiere.

Programa de PCR

El programa de PCR para la amplificación del fragmento del gen de la protrombina fue modificado con base a las condiciones reportadas por Ripoll L.

2 min. a 94°C	
20 seg. a 94°C	} 33 ciclos
20 seg. a 54°C	
20 seg. a 72°C	
3 min. a 72°C	
soak a 4°C	

4.2.5. Digestión de DNA.

Una vez que se ha obtenido el producto de amplificación por PCR (118 pb), este es digerido por la enzima de restricción TaqI, una enzima que reconoce la secuencia TCGA (Figura 13). En la secuencia amplificada (tipo silvestre) del gen de la protrombina no existe una secuencia diana que pueda reconocer la enzima de restricción Taq I, de modo que este sitio es creado, como se mencionó anteriormente, por medio de mutagénesis dirigida.

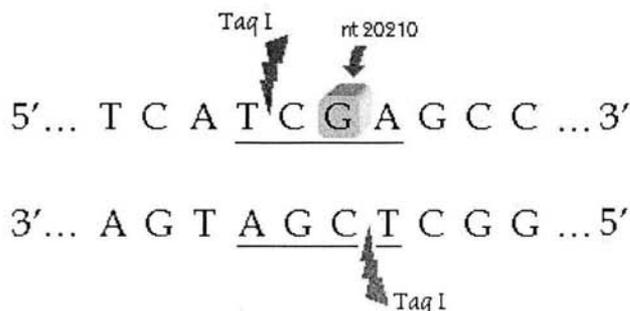


Figura 13. Digestión por la enzima TaqI. Esta endonucleasa reconoce la secuencia TCGA y corta ambas hebras del DNA de doble cadena entre los nucleótidos T y C. En el tipo silvestre el nucleótido 20210 es una G; cuando se presenta la mutación G20210A el sitio diana que reconoce la TaqI desaparece.

Restricción del fragmento amplificado con la endonucleasa Taq I⁶⁹

- 1 Preparar el buffer necesario, dependiendo la cantidad de muestras.

2U Taq I	0.2µl
Buffer 10 X	1.8µl
H ₂ O	1µl

- 2 Agregar 3µl de Buffer de restricción a cada muestra amplificada.
- 3 Realizar la restricción durante 4hrs a 65°C

4.2.6. Electroforesis en gel de agarosa.

Cuando se corta una molécula de DNA con una enzima de restricción adecuada, ésta se divide en diversos fragmentos, que pueden ser separados por tamaños mediante electroforesis en gel. El DNA fragmentado se carga en el extremo de un gel de agarosa y, cuando se hace pasar corriente eléctrica a través del gel, cada fragmento migra a una velocidad que es dependiente de la cantidad de pares de bases que contenga. Este movimiento se traduce en una serie de bandas, cada una de las cuales se corresponde con fragmentos de tamaños decrecientes a medida que se avanza por el gel.

La electroforesis en gel de agarosa se realiza de la manera siguiente:

- 1 Preparar agarosa al 4% (disuelta en TBE 1X) y calentar hasta ebullición.
- 2 Llenar la cámara de electroforesis con la agarosa y colocar el peine para formar los pozos.
- 3 La agarosa debe gelificar en aproximadamente 10min. para después agregar TBE 1X suficiente para cubrirla.
- 4 Cargar cada uno de los pozos con una mezcla que contenga 6 μ l de colorante CCIII y 7 μ l de muestra de DNA previamente digerida con la enzima TaqI durante 4 hrs. a 65°C.
- 5 Cargar un pozo con marcador de peso molecular adecuado.
- 6 Cerrar la cámara y conectar los electrodos a la fuente de poder y a la cámara de electroforesis.
- 7 Ajustar la corriente a 180 V
- 8 Una vez que termine el corrimiento de las muestras a través del gel, éste se retira para ser introducido en bromuro de etidio por aproximadamente 1min.
- 9 Retirar y enjuagar con agua por 5min.
- 10 Observar en transiluminador de luz UV y tomar una fotografía de ser necesario.

4.2.7. Análisis de genotipos.

Determinación de la mutación G20210A

Una vez que se resolvieron las muestras en gel de agarosa al 4% se obtiene un patrón de bandas similar el que se muestra en la figura 14.

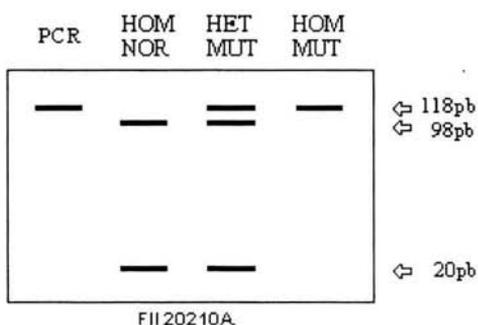


Figura 14. Alelo G20210A. En esta figura se muestra el patrón de bandas que se obtiene en cada caso. El primer carril muestra el producto de PCR sin digerir (118 pb); el segundo carril muestra el tipo silvestre, es decir G/G que es homocigoto normal; en el tercer carril se observa un heterocigoto mutado G/A; y por último un homocigoto para la mutación G20210A, A/A.

5. RESULTADOS

5.1. *Distribución de la muestra obtenida.*

La población analizada en este estudio consistió en un total de 466 sujetos aparentemente sanos, de los cuales fueron 139 mujeres y 327 hombres con un rango de edades comprendido entre los 18 y 62 años, y un promedio de 33.7 años. Todos los individuos fueron donadores que acudieron al banco de sangre del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" provenientes de distintos estados de la República Mexicana.

Cada uno de los sujetos control declaró ser hijo de padres mexicanos y/o en su defecto tener un abuelo español.

Población Total n (%)	Mujeres n (%)	Hombres n (%)
466 (100)	139 (29.82)	327 (70.18)

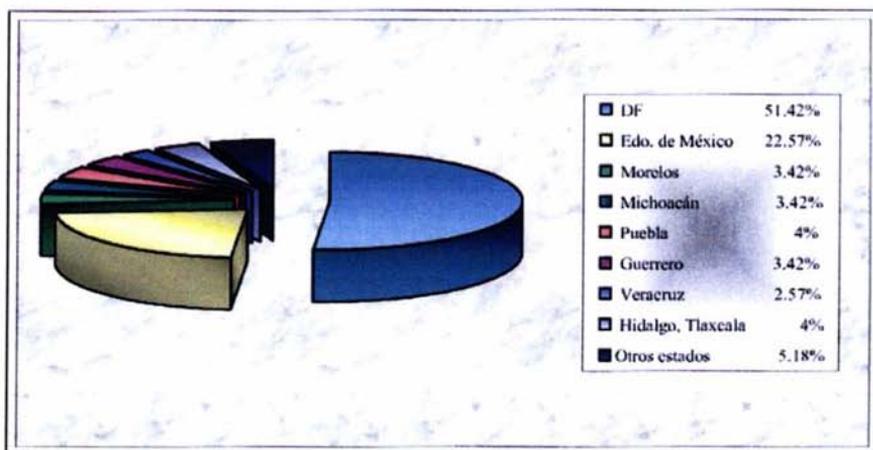
Tabla 10. Distribución de sexos en la muestra.

Rango de edades	18 – 62 años
Edad promedio	33.7 años

Tabla 11. Distribución de edades en la muestra.

De manera notable, el porcentaje más alto de los individuos estudiados fueron provenientes del Distrito Federal (51.42 %). A su vez, el resto de la población en análisis estuvo conformada por individuos pertenecientes a distintos estados de la República Mexicana, principalmente del Estado de México (22.57 %), seguido por los estados de Puebla, Morelos, Michoacán y Guerrero con un porcentaje similar entre ellos. Mostrando un porcentaje menor se encontraron los estados de Veracruz, Hidalgo y Tlaxcala. Por último, el resto de los sujetos control fueron individuos provenientes de diversos estados de la República Mexicana como San Luis Potosí, Sonora, Oaxaca, entre otros.

En la gráfica 1 se muestran los porcentajes que corresponden al número de individuos provenientes de cada uno de los estados mencionados en la misma.



Gráfica 1. Gráfica de poblaciones. La gráfica muestra aquellos estados de la República Mexicana de donde proceden principalmente los sujetos control analizados en el INN y N. El porcentaje indicado corresponde al número de individuos provenientes de cada uno de los estados de la República Mexicana con respecto a la muestra total de sujetos control.

5.2. Análisis de Genotipos.

En aquellos casos en que no existió la mutación en ninguno de los alelos (homocigotos normales), ambas cadenas de DNA fueron cortadas por la enzima de restricción TaqI, de modo que se observaron dos bandas de 98 y 20 pb respectivamente. En aquellos casos en que uno de los alelos presentó la mutación G20210A (heterocigotos mutados), una de las cadenas de DNA fue cortada, generando dos bandas de 98 y 20 pb, mientras que en la segunda cadena desapareció el sitio de reconocimiento para la enzima TaqI y en consecuencia se obtuvo una banda adicional de 118 pb. No se observó ningún homocigoto para la mutación G20210A del gen de la protrombina. En este caso se habría observado el fragmento que se obtuvo de la amplificación íntegro (118pb), dado que en ambas cadenas del DNA dúplex habría desaparecido el sitio diana de la enzima TaqI.

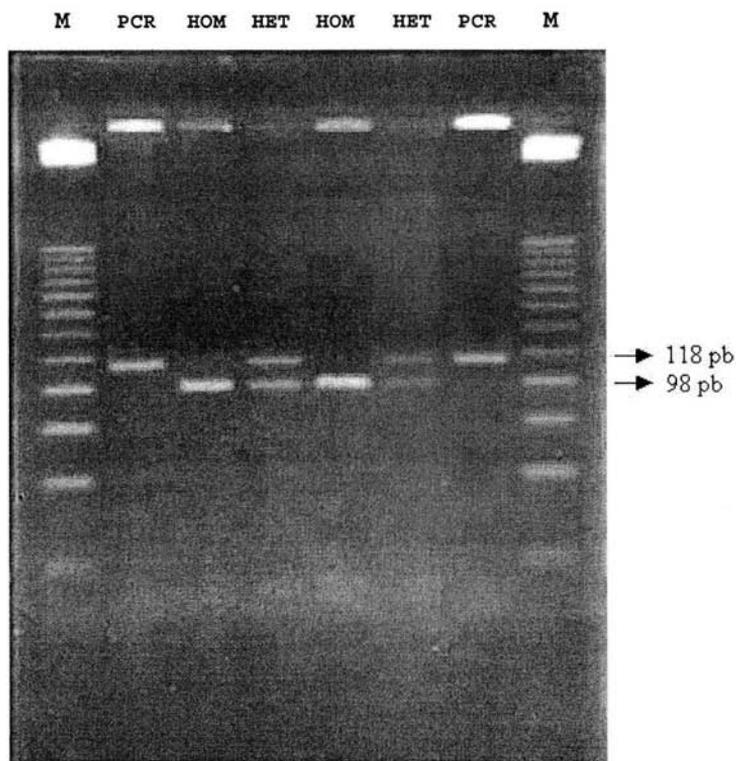


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 4%. En los carriles 1 y 8 se observan los marcadores de peso molecular (25 pb); en los carriles 2 y 7 se presenta el producto de PCR sin restricción; los carriles 3 y 5 contienen muestras de homocigotos normales y por último, los carriles 4 y 6 muestran el patrón de bandas de heterocigotos para la mutación.

5.3. Frecuencia de la mutación G20210A en población mexicana.

Para realizar la determinación de las frecuencias alélicas de la mutación G20210A en el gen de la protrombina se tabularon los resultados obtenidos para una población total de 466 individuos analizados para esta mutación, y posteriormente se construyó una tabla de contingencia de 2 x 2 para comparar las frecuencias obtenidas entre hombres y mujeres.

GENOTIPO	H n (%)	M n (%)	Población Total n (%)
20210 GG	325(69.74)	134(28.76)	459(98.5)
20210 AG	2(0.43)	5(1.07)	7(1.5)
20210 AA	0	0	0

$\chi^2 = 5.88$; $p = 0.015$; odds ratio = 6.06; IC 95 % (0.97 - 64.13)

Tabla 12. Frecuencias genotípicas del alelo G20210A en la muestra. La tabla muestra los resultados obtenidos para la muestra analizada en el laboratorio de genética del INN y N. Donde H: Hombres; M: Mujeres; GG representa el estado homocigoto normal para la mutación; AG el estado heterocigoto y AA el estado homocigoto para la mutación.

De un total de 466 individuos analizados para la mutación G20210A del gen de la protrombina, se encontraron 7 portadores heterocigotos de los cuales fueron 5 mujeres y 2 hombres, lo que corresponde a una prevalencia de 1.5%. Esta diferencia entre sexos respecto a la frecuencia del alelo indica que la mutación es más frecuente en mujeres que en hombres, sin embargo, el análisis estadístico demuestra que no existe diferencia significativa entre hombres y mujeres con respecto a este alelo.

6. DISCUSION

6.1. *Comparación con otros estudios.*

Desde que la mutación en el gen de la protrombina fue descubierta por Poort en 1996, se han desarrollado numerosos estudios alrededor del mundo para conocer las prevalencias que se presentan en las distintas poblaciones. A través de estas investigaciones se han encontrado variaciones interesantes entre los diferentes grupos raciales, aunque de manera general se ha determinado un rango de entre 1 – 4% para la prevalencia de la mutación en población caucásica normal.

En el reporte original de la mutación en el gen de la protrombina se encontró una frecuencia de 1% en una muestra de población Holandesa, resultado que es estadísticamente similar al obtenido para la muestra de población mexicana aparentemente normal analizada en el presente trabajo (1.5%). En un estudio posterior, los mismos investigadores analizaron una segunda muestra de población Holandesa, obteniendo esta vez un a frecuencia de 1.2%, resultado que es muy similar al obtenido en la primera muestra e igual al encontrado en un estudio realizado por otro grupo de investigadores también en población Holandesa.

De manera semejante, se ha encontrado que, estadísticamente, no existe una diferencia significativa entre la frecuencia encontrada para la población de Suecia (1.4%) y la obtenida para la muestra de población mexicana (1.5%). Este hallazgo coincide con el análisis realizado entre la población de Reino Unido, para la cual se han obtenido frecuencias de 1.2% y 2.8%, y la muestra de población mexicana.

Las frecuencias del alelo G20210A del gen de la protrombina halladas en España son notablemente mayores que las de Holanda y México, mostrando una prevalencia de 4.28% en Navarra (Pamplona), una región al norte de España donde la mayor parte de la gente comparte un antecedente Vasco que difiere del resto de España y otras poblaciones de los alrededores. La elevada frecuencia que presenta España para el alelo G20210A se confirmó en otro estudio realizado en la misma región de Pamplona para el cual se obtuvo un resultado de 3.78%. A su vez, para Barcelona, España, se determinó una frecuencia de 6.5%, lo que demostró una vez más la alta prevalencia de la mutación en este país.

Cercano a la región de España, en Portugal se presenta una frecuencia de 5% para el estado heterocigoto de la variante genética, porcentaje que difiere estadísticamente de la frecuencia obtenida en la muestra de población mexicana.

En un estudio realizado para investigar la prevalencia de portadores de la mutación en varias poblaciones, se combinaron los datos de once centros médicos en nueve países, principalmente de Europa, encontrando que existe una relación entre la prevalencia de la mutación y la latitud geográfica en esta región (incluyendo Israel). En aquellos centros localizados al norte de la latitud 50°N (Malmö, Manchester, Sheffield, Ámsterdam y Leiden), el número de individuos portadores heterocigotos de la mutación G20210A correspondió a una frecuencia de 1.7%, en tanto que, para aquellos centros que se localizan al sur de la latitud 50°N (París, Viena, Ferrara y Tel Aviv) se encontró una prevalencia de 3.0%. De manera interesante, se observa que, en aquellos centros situados al sur de la latitud 50°N, la prevalencia de la variante en el gen de la protrombina es casi el doble de la encontrada en aquellas regiones al norte de dicha latitud.

Los países que se encuentran alrededor del área del Mediterráneo como España, Italia, Turquía y Grecia, muestran una prevalencia para la mutación G20210A relativamente alta, siendo esta de 6.5%, 4.6%, 6.2% y 4.0% respectivamente, con excepción de Francia, que ha mostrado un porcentaje de 1.0% para la variante genética. La diferencia notable entre los valores descritos para cada país pudiera ser explicada por la localización ligeramente hacia el norte de Europa que muestra Francia.

De manera contrastante con los países de la zona del Mediterráneo, Islandia, un país establecido por inmigrantes mayormente provenientes de Irlanda, Noruega y Escocia ha mostrado prevalencias relativamente bajas que oscilan entre 0.9% y 0.92%; resultados que son estadísticamente similares a los encontrados en la muestra de población mexicana.

La mutación G20210A del gen de la protrombina ha presentado prevalencias considerables únicamente en población Caucásica. Entre individuos de raza negra, el estado heterocigoto para la mutación G20210A se encuentra casi ausente. Cuando se combinaron los datos de diferentes estudios realizados en personas de raza negra, incluyendo Africanos, Africo-Americanos y judíos etíopes de Israel, la prevalencia fue muy baja (0.43%), al igual que en población de descendencia Asiática entre las cuales se encuentra prácticamente ausente la mutación. A lo largo de múltiples investigaciones se ha relacionado a la población mexicana con la población asiática y por tanto, podría pensarse que en este caso la frecuencia de la mutación G20210A en nuestra población debería ser similar a la encontrada en población asiática, aun así los resultados muestran que no existe una semejanza estadística entre estas poblaciones, esto probablemente sea debido a la mezcla de razas que ha tenido lugar a lo largo de los años.

En judíos pertenecientes a diferentes grupos étnicos se han encontrado prevalencias altas. De 6.7% en judíos Ashkenazi (Europeos), que es la prevalencia más alta encontrada hasta el momento entre los estudios de poblaciones. De 5.5% en judíos Sphardic del norte de África ya mencionados anteriormente. En judíos del medio oriente propagados en Iraq, Irán y Yemen se han observado

prevalencias de 1% a 4% que se asemejan a las prevalencias reportadas en poblaciones Europeas. Es interesante notar que en judíos etíopes que comparten genes africanos no se encontró el alelo G20210A.

En México, la prevalencia de la mutación G20210A fue de 1.5%, la cual se encuentra dentro del rango general 1-4% para la población Caucásica normal. Esta prevalencia se asemeja a la encontrada en aquellos países en la región norte de Europa, es decir, tiene una prevalencia relativamente baja, aunque es mayor a la que presentan aquellas poblaciones de descendencia Africana o Asiática.

Debido al antecedente de colonización Española que se tiene en nuestra población y tomando en cuenta que los criterios de inclusión y exclusión en nuestra muestra consideran población de ascendencia española, se podría pensar que la población mexicana tendría una frecuencia alta para la mutación G20210A que fuera parecida a la que se presenta en países de Europa, aunque en la práctica los resultados obtenidos en este estudio muestran que estadísticamente estas poblaciones no son similares en cuanto a la frecuencia del alelo 20210A. Esto nos lleva a pensar que, probablemente, aunque tenemos una ascendencia de población Europea, más específicamente Española, nuestra frecuencia es mucho menor a la encontrada en aquellos países debido a la mezcla interracial que se ha dado al paso del tiempo, y a través de la cual se podría hablar de un gen de tipo "recesivo" que al combinarse con otras poblaciones (razas) distintas, que posiblemente contaran con prevalencias bajas, se pudo haber perdido la condición "dominante" del alelo, o se pudo haber "diluido" dicho alelo y ser menos determinante para la manifestación del padecimiento o simplemente reducir la frecuencia de éste en población normal.

De igual manera podría suponerse entonces que, al suscitarse mezclas interraciales directamente con razas que presenten frecuencias elevadas de la mutación en población normal, podría aumentar la carga genética y tener una frecuencia más elevada a nivel general, y posiblemente, aumentar la probabilidad de presentar el padecimiento.

A pesar de que el número de mujeres consideradas en el análisis para la mutación es mucho menor al número de hombres, la frecuencia del alelo 210210A resultó ser considerablemente mayor en personas del sexo femenino, aunque estadísticamente se comprobó que no existe una diferencia significativa que soporte dicha discrepancia y que, por lo tanto, indique que las mujeres tengan una mayor probabilidad de ser portadoras del alelo mutado y en consecuencia, de poseer un factor considerado de riesgo para verse afectado en algún momento por la enfermedad.

De manera concordante con los resultados encontrados en prácticamente todas las poblaciones en las que se han desarrollado estudios similares para ésta mutación, el estado homocigoto para el alelo

se encontró ausente en la muestra de población mexicana seleccionada para la realización de este estudio. Esto puede ser debido a que, en primera instancia, el estado homocigoto para la mutación es sumamente infrecuente y en segunda, debido a que los únicos casos reportados hasta el momento son pacientes que ya han padecido al menos un evento vascular, y nuestra población considera únicamente personas aparentemente normales sin antecedentes de padecimientos vasculares.

Todas estas investigaciones contribuyen al estudio de la constitución genética de los individuos que conforman cada grupo racial. Su importancia radica en la posibilidad de establecer si una determinada variante en dicha constitución, representa un factor de riesgo para el desarrollo de una enfermedad, y si ese factor de riesgo afecta a nuestra población. En el caso de la variante G20210A en el gen de la protrombina el riesgo se encuentra relacionado con la posibilidad de verse afectado por trombosis venosa cerebral de naturaleza idiopática, que al no tener una causa asignable pudiera ser investigada acerca de la presencia de un determinante genético hereditario tal como esta mutación. Esto, principalmente encaminado a la prevención de una segunda manifestación del padecimiento ya que como se sabe, este tipo de enfermedades presentan un alto índice de recurrencia. A su vez, al contar con antecedentes de tipo hereditarios que supongan un riesgo para desarrollar la enfermedad, podrán tomarse las acciones preventivas convenientes.

7. CONCLUSIONES

Se determinó la frecuencia para la mutación G20210A del gen de la protrombina en una muestra de la población mexicana aparentemente normal con antecedentes de mestizaje, hallando que dicha mutación se encuentra presente en la población mexicana con una frecuencia de 1.5% en su forma heterocigota (AG), frecuencia que se encuentra dentro del rango general establecido de 1 a 4% en población normal.

La muestra de población mexicana estudiada presenta únicamente el genotipo heterocigoto para la mutación en el gen de la protrombina G20210A. El estado homocigoto para el alelo no se presentó en la muestra de población mexicana seleccionada para la realización del presente estudio.

A pesar de ser considerablemente menor el número de mujeres analizadas para la mutación en el gen de la protrombina, en comparación con el número de hombres, la frecuencia del alelo G20210A aparenta ser mayor en mujeres que en hombres, aunque estadísticamente no existe una diferencia significativa que soporte dicha discrepancia.

La muestra de población mexicana estudiada resultó ser muy similar a las poblaciones Europeas ubicadas hacia la región norte de dicho continente, particularmente Holanda, Suecia, Reino Unido, Francia e Islandia. Dichas regiones presentan menores frecuencias que las reportadas para aquellos países que se localizan hacia el sur del continente Europeo.

Para saber si el alelo heterocigoto AG es un factor de riesgo para desarrollar trombosis venosa cerebral en nuestra población, habrán de analizarse los genotipos de personas que padezcan la enfermedad y comparar sus frecuencias con las reportadas en este estudio.

Los hallazgos encontrados en el presente trabajo servirán como complemento para conocer los factores de riesgo genéticos que se encuentran involucrados de alguna manera en el desarrollo de enfermedades vasculares en la población mexicana, además de conocer el mapa genético de nuestra población ya que se sabe que la nuestra es una mezcla de razas con características genéticas particulares, y que, enfermedades vasculares de gran importancia en países desarrollados, están emergiendo actualmente en los países en desarrollo como el nuestro, además de nuevos factores de riesgo que se han ido sumando a la lista ya existente de factores de riesgo clásicos como la hipertensión, diabetes, etc., y que gracias al progreso de la biología molecular se han ido descubriendo.

8. BIBLIOGRAFIA

1. McKenzie, S.B. 2000. *Hematología clínica*. 2a. edición. Ed. Manual Moderno. D.F. México. pp 603-625.
2. Suttie, J.W., Jackson, C.M. 1977. Prothrombin Structure, Activation, and Biosynthesis. *Physiological Reviews*. 57: 1-70.
3. Colman, RW. 2001. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 4th. edition., edited by Colman, R.W., Hirsh, J., Marder, V.J., Clowes, A.W., George, J.N. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
4. Walz, D.A., Hewett-Emmett, D., Seegers, W.H. 1977. Amino acid sequence of human prothrombin fragments 1 and 2. *Biochemistry*. 74: 1969-1972.
5. Butkowski, R.J., Elion, J., Downing, M.R., Mann, K.G. 1977. Primary structure of human prothrombin 2 and α -thrombin. *J Biol Chem*. 252: 4942-4957.
6. Degen, S.J.F., MacGillivray, R.T.A., Davie, E.W. 1983. Characterization of the Complementary Deoxyribonucleic Acid and Gene Coding for Human Prothrombin. *Biochemistry*. 22: 2087-2097.
7. Royle, N.J., Irwin, D.M., Koschinsky, M.L., McGillivray, R.T.A., et al. 1987. Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. 13: 285-292.
8. Poort, S.R., Rosendaal, F.R., Reitsma, P.H., Bertina, R.M. 1996. A Common Genetic Variation in the 3'-translated Region of the Prothrombin Gene is Associated With Elevated Plasma Prothrombin Levels and an Increase in Venous Thrombosis. *Blood*. 88: 3698-3703.
9. Furie, B., Furie, B.C. 1992. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med*. 326: 800-806.
10. Guyton, A., Hall, J. 2001. *Tratado de Fisiología Médica*. 10a. edición. McGraw-Hill. D.F. México. pp 511-516.
11. Davie, E.W., Fujikawa, K., Kisiel, W. 1991. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*. 30: 10363-10370.
12. Bello, A. 2001. *Hematología básica*. 3a. edición. Ed. PRADO. D.F. México. pp 372-383.
13. Furie, B., Furie, B.C. 1988. The molecular basis of blood coagulation. *Cell*. 53: 505-518.
14. Mann, K.G., Gaffney, D., Bovill, E.G. 1995. Molecular biology, biochemistry, and lifespan of plasma coagulation factors, in *Hematology*. 5th. edition., edited by Williams, Butler, E., Lichtman, M. A., Coller, B.S., Kipps, T.J. McGraw-Hill. pp 1206-1216.
15. Jesty, J., Nemerson, Y. 1995. The pathways of blood coagulation, in *Hematology*. 5th. edition., edited by Williams, Butler, E., Lichtman, M. A., Coller, B.S., Kipps, T.J. McGraw-Hill. pp 1227-1230.
16. Colman, RW. 1987. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 2nd. edition., edited by Colman, R.W., Hirsh, J., Marder, V.J. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

17. Jackson, C.M. 1987. Mechanisms of Prothrombin Activation, in *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 2nd. edition., edited by Colman, R.W. Lippincott Company, Philadelphia. pp 135-143.
18. Reiner, A.P., Davie, E.W. 1995. Introduccion to Hemostasis and the Vitamin K-Dependent Coagulation Factors, in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th., edition., edited by Scriver, C.R., Beaudet, A.C., Sly, W.S., Valle, D. McGraw-Hill, Inc. New York. U.S.A. Vol.II. pp 3181-3189.
19. Mann, K.G. 1999. Biochemistry and Physiology of Blood Coagulation. *Thromb Haemost.* 82: 165-174.
20. Strayer, L. 1995. *BIOQUIMICA*. 4a. edición. Ed. Reverté, S.A. Barcelona, España.
21. Nguyen, A. 2000. Prothrombin G20210A polymorphism and thrombophilia. *Mayo Clin Proc.* 75: 595-604.
22. Degen, S.J.F., Sun, W.Y. 1998. The biology of prothrombin. *Critical Rev in Eukaryotic Gene Expression.* 8: 203-224.
23. von Ahsen, N., Lewczuk, P., Schütz, E., Oellerich, M., et al. 2000. Prothrombin activity and concentration in healthy subjects with and without the prothrombin G20210A mutation. *Thromb Res.* 99: 549-556.
24. Williams. 2001. *Hematology*. 6th. edition., edited by Williams, Beutler, E., Lichtman, M.A., Coller, B.S., Kipps, T.J., Seligsohn, U. McGraw-Hill.
25. Degen, S.J.F., Davie, E.W. 1987. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry.* 26: 6165-6177.
26. Presnell, S.R., Stafford, D.W. 2002. The Vitamin K-dependent Carboxylase. *Thromb Haemost.* 87: 937-946.
27. Girolami, A., Sacarano, L., Saggiorato, G., Girolami, B., et al. 1998. Congenital deficiencies and abnormalities of prothrombin. *Blood Coagul Fibrinol.* 9: 557-569.
28. <http://www.11q.org/11qlinks.htm>
29. Lewin, B. 2001. *genes VII*. Edición Original. Ed. MARBÁN. Madrid. España.
30. Smith, C.A., Wood, E.J. 1998. *Biología Molecular y Biotecnología*. 1a. edición. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. Wilmington, Delaware, E.U.A.
31. Bancroft, J.D., Schaefer, L.A., Degen, S.J.F. 1990. Characterization of the *Alu*-rich 5'-flanking region of the human prothrombin-encoding gene: identification of a positive *cis*-acting element that regulates liver-specific expression. *Gene.* 95: 253-260.
32. Chow, B.K-C., Ting, V., Tufaro, F., MacGillivaray, R.T.A. 1991. Characterization of a novel liver-specific enhancer in the human prothrombin gene. *J Cell Biochem.* 266: 18927-18933.
33. Lane, D.A., Grant, P.J. 2000. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood.* 95: 1517-1532.
34. Pérez-Requejo, J.L. 2002. La Trombosis. <http://www.aventis.com.ve/trombo.htm>

35. Bovill, E.G., Hasstedt, S.J., Leppert, M.F., Long, G. 1999. Hereditary Thrombophilia as a Model for Multigenic Disease. *Thromb Haemost.* 82: 662-666.
36. Párramo, J.A., Rocha, E. 1991. Hipercoagulabilidad y estados trombofílicos. *Sangre.* 38(Supl3): 11-17.
37. Rosendaal, F.R. 1993. Venous Thrombosis: a multicausal disease. *Lancet.* 353: 1167-1173.
38. Orúe, M.T. 2000. Thrombophilia and stroke. Servicio de Hematología. Hospital de Navarra. Pamplona. <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/suple12/suple7.html>
39. Bertina, R.M., Rosendaal, F.R. 1998. Venous Thrombosis-The interaction of genes and environment. *N Engl J Med.* 338: 1840-1841.
40. Bertina, R.M., Koeleman, B.P.C., Koester, T., Rosendaal, F.R., et al. 1994. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 369: 64-67.
41. Lens, D., Otero, A.M., Cotic, G., Henry, S., et al. 2000. Diagnóstico molecular de factores protrombóticos: primeros casos del factor V Leiden y protrombina 20210A en Uruguay. *Rev Med Uruguay.* 16: 39-44.
42. Rosendaal, F.R. 1999. Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost.* 82: 610-619.
43. Martinelli, I., Taioli, E., Bucciarelli, P. 1999. Interaction between G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 700
44. Batlle, J., López, M.F. 1999. Importancia del estudio del factor V Leiden y del alelo 20210A del gen de la protrombina en la enfermedad tromboembólica. *Sangre.* 44: 3-6.
45. Bauer, K.A., Humphries, S., Smillie, B., Li, L., et al. 2000. Prothrombin Activation Is Increased among Asymptomatic Carriers of the Prothrombin G20210A and Factor V Arg506Gln Mutations. *Thromb Haemost.* 84: 396-400.
46. Soria, J.M., Almasy, L., Souto, J.C., Tirado, I., et al. 2000. Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. *Blood.* 95: 2780-2785.
47. Ceelie, H., Bertina, R.M., van Hylckama, A., Rosendaal, F.R., et al. 2001. Polymorphisms in the Prothrombin Gene and their Association with Plasma Prothrombin Levels. *Thromb Haemost.* 85: 1066-1070.
48. Martinelli, I., Sacchi, E., Landi, G., Taioli, E., et al. 1998. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med.* 338: 1793-1797.
49. Reuner, K.H., Ruf, A., Grau, A., Rickmann, H., et al. 1998. Prothrombin Gene G₂₀₂₁₀ → A Transition Is a Risk Factor for Cerebral Venous Thrombosis. *Stroke.* 29: 1765-1769.
50. Martinelli, I., Franchi, F., Akwan, S., Bettini, P., et al. 1997. The transition G to A at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is not associated with cerebral ischemia. *Blood.* 90: 3806.
51. Gardemann, A., Arsic, T., Katz, N. 1999. The factor II G20210A and factor V G1691A gene transitions and coronary heart disease. *Thromb Haemost.* 81: 208

52. De Stefano, V., Chiusolo, P., Paciaroni, K., Casorelli, Ida., et al. 1998. Prothrombin G20210A mutant genotype is a risk for cerebrovascular ischemic disease in young patients. *Blood*. 91: 3562-3565.
53. Rosendaal, F.R., Siscovick, D.S., Schwartz, S.M., Psaty, B.M., et al. 1997. A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood*. 90: 1747-1750.
54. Doggen, C.J.M., Cats, V.M., Bertina, R.M., Rosendaal, F.R. 1998. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation*. 97: 1037-1041.
55. Corral, J., González-Conejero, R., Lozano, M.L., Rivera, J., et al. 1997. The venous thrombosis risk factor 20210 A allele of the prothrombin gene is not a major risk factor for arterial thrombotic disease. *Br J Haematol*. 99: 304-307.
56. Ridker, P.M., Hennekens, C.H., Miletich, J.P. 1999. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation*. 99: 999-1004.
57. Ferraresi, P., Marchetti, G., Legnani, C., Cavallari, E., et al. 1997. The heterozygous 20210 G/A prothrombin genotype is associated with early venous thrombosis in inherited thrombophilias and is not increased in frequency in artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17: 2418-2422.
58. Scott, C.M., Hanley, J.P., Ludlam, C.A., Stirling, D. 1997. Homozygosity for a factor II polymorphism associated with thrombosis during pregnancy [abstract]. *Thromb Haemost*. 77(suppl): 770.
59. Howard, T.E., Marusa, M., Boisz, J., Young, A., et al. 1998. The Prothrombin Gene 3'-Untranslated Region Mutation Is Frequently Associated With Factor V Leiden in Thrombophilic Patients and Shows Ethnic-Specific Variation in Allele Frequency. *Blood*. 91: 1092.
60. Souto, J.C., Mateo, J., Soria, J.M. 1999. Homozygotes for prothrombin gene 20210 A allele in a thrombophilic family without clinical manifestations of venous thromboembolism. *Haematologica*. 84: 627-632.
61. Margaglione, M., Brancaccio, V., Giuliani, N., D'Andrea, G., et al. 1998. Increased Risk for Venous Thrombosis in Carriers of the Prothrombin G→A²⁰²¹⁰ Gene Variant. *Ann Intern Med*. 129: 89-93.
62. Morange, P.E., Barthelet, M.C., Henry, M., Fontanet, H., et al. 1998. A Three-generation Family Presenting Five Cases of Homozygosity for the 20210 G to A Prothrombin Variant. *Thromb Haemost*. 80: 859-860.
63. Makris, M., Preston, F.E., Beauchamp, N.J., Cooper, P.C., et al. 1997. Co-inheritance of the 20210A Allele of the Prothrombin Gene Increases the Risk of Thrombosis in Subjects with Familial Thrombophilia. *Thromb Haemost*. 78: 1426-1429.
64. De Stefano, V., Martinelli, I., Mannucci, P.M., Paciaroni, K., et al. 1999. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A. *N Engl J Med*. 341: 801-806.
65. Lindmarker, P., Schulman, S., Sten-Linder, M., Wiman, B., et al. 1999. The risk of recurrent venous thromboembolism in carriers and non-carriers of the G1691A allele in the coagulation

- factor V gene and the G20210A allele in the prothrombin gene. *Thromb Haemost.* 81: 684-689.
66. Croft, S.A., Daly, M.E., Steeds, R.P., Channer, K.S., et al. 1999. The prothrombin 20210A allele and its association with myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 81: 861-864.
 67. Mansilha, A. Araújo, F. Sampaio, S., Ribeiro, L.M.C., et al. 2002. The PORtromb Project: Prothrombin G20210A mutation and venous thromboembolism in young people. *Cardiovascular Surgery.* 10: 45-48.
 68. Leroyer, C., Mercier, B., Oger, E., Chenu, E., et al. 1998. Prevalence of 20210^a allele of the prothrombin gene in venous thromboembolism patients. *Thromb Haemost.* 80: 49-51.
 69. Olafsson, I., Hjaltadóttir, S., Ónundarson, P.T., Þórarinsdóttir, R., et al. 1998. Prevalence of Factor V_{Q506} and prothrombin 20210A mutations in an apparently healthy Icelandic population and patients suffering from venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 79: 685-686.
 70. Zivelin, A., Rossenberg, N., Faier, S., Kornbrot, N., et al. 1998. A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Blood.* 92: 1119-1124.
 71. Zabalegui, N., Montes, R., Orbe, J., Ayape, M.L., et al. 1998. Prevalence of FVR⁵⁰⁶Q and prothrombin 20210A mutations in the Navarrese population. *Thromb Haemost.* 80: 522-523.
 72. Montes, R. Departamento de Hematología. Clínica Universitaria. Pamplona. 2000. Incidencia del factor V Leiden en una población sana y en pacientes con trombosis en la comunidad foral de Navarra.
<http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/textos10/resumen2.html>
 73. Roseendal, F.R., Doggen, C.J.M., Zivelin, A., Arruda, V.R., et al. 1998. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost.* 79: 706-708.
 74. Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E.F. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual.* 2nd. edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA, vol. 1.
 75. Eisenstein, B.I. 1990. The polymerase chain reaction. A new method for using molecular genetics for medical diagnosis. *New Engl J Med.* 322: 178-183.
 76. Arnheim, N., Erlich, H. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Ann Rev Biochem.* 61:131-156
 77. PCR <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/RecombinantDNA.html>
 78. Ripoll, L., Paulin, D., Thomas, S., Drouet, O. 1997. Multiplex PCR-mediated site-directed mutagenesis for one-step determination of factor V Leiden and G20210A transition of the prothrombin gene. *Thromb Haemost.* 78: 960-1.

ANEXO I

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

RCLB (Buffer de lisis de glóbulos rojos)

Solución Stock: p/2000ml

Tris 1M pH 7.6 20ml

MgCl₂ 1M 10ml

NaCl 5M 4ml

H₂O desionizada estéril c.b.p. 2000ml

FENOL SATURADO

- 1 Fundir fenol a 68°C
- 2 A 300ml de fenol fundido se le adicionan:

Agua desionizada estéril 200ml

β-mercaptoetanol 2ml

Tris 2M pH 8.0 2ml

α-hidroxiquinoleina 500mg

- 3 Mezclar con agitación durante toda la noche, protegido de la luz.
- 4 Ajustar el pH a 7.6 con aproximadamente 292.5μl de NaOH 10N.
- 5 Almacenar en frasco ámbar a 4°C
- 6 Usar la fase inferior para la extracción de DNA.

FENOL-CLOROFORMO-ALCOHOL ISOAMILICO

Se prepara mezclando:

Fenol saturado 25ml

Cloroformo 24ml

Alcohol isoamílico 1ml

CLOROFORMO-ALCOHOL ISOAMILICO

Se prepara mezclando:

