



**HOSPITAL DE LA MUJER  
CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES DEL FACTOR V  
DE LEIDEN, DEL GEN DE LA  
METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA E  
INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO, DE LA  
COAGULACIÓN EN MUJERES CON PÉRDIDA  
GESTACIONAL RECURRENTE, ATENDIDAS EN EL  
HOSPITAL DE LA MUJER DE ENERO DE 2017 A  
DICIEMBRE DE 2018**

**TESIS**

**PRESENTADA POR**

**Judith Jiménez Jiménez**

**PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y  
OBSTETRICIA**

**ASESOR(ES)**

**Dr. Daniel Ely Bravo Aguirre**

**Dr. Rafael Gutiérrez Campos**

**Lic. En Biotecnología Eli Daniel García Martínez**

**Aguascalientes, Ags., diciembre de 2018**



**ISSEA**

SECRETARÍA DE SALUD DEL ESTADO

**COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN**

AGUASCALIENTES, AGS. 23 DE ABRIL DEL 2018

**A QUIEN CORRESPONDA:**

EL COMITÉ ESTATAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD, BASADO EN LOS ESTATUTOS CONTENIDOS EN EL MANUAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD, HA TENIDO A BIEN REVISAR EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN INTITULADO.

**"PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES DE MTHFR METILENTETHAHIDROFOLATO REDUCTASA EN MUJERES CON PERDIDA FETAL RECURRENTE, ATENDIDOS EN EL HOSPITAL DE LA MUJER DEL ISSEA DE ENERO 2017 A DICIEMBRE DE 2018"**

OTORGANDO EL DICTAMEN DE **"ACEPTADO"** NÚMERO DE REGISTRO: **022 ISSEA-022/18**

**INVESTIGADOR (S) DE PROYECTO:**

Dra. Judith Jiménez Jiménez

**LUGAR DE DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN:**

Hospital Rincón de Romos.

**TIPO DE INVESTIGACIÓN:**

Investigación para Obtención de Grado de Especialidad en Ginecología y Obstetricia

**ASESOR (ES):**

Dr. Daniel Ely Bravo Aguirre (Subdirector del Hospital de la Mujer de Aguascalientes)

Dr. Rafael Gutiérrez (Investigador de la Universidad Autónoma de Aguascalientes)

Dr. José Rafael Villafán Bernal (Investigador de la Universidad Autónoma de Aguascalientes)

ESPERANDO QUE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN REDUNDE EN BENEFICIO A NUESTRA POBLACIÓN, QUEDAMOS A SUS ÓRDENES.

**ATENTAMENTE:**

  
**DR. JAVIER GÓNGORA ORTEGA, MCM**  
**SECRETARIO TÉCNICO**  
C.C.P.- ARCHIVO





HOSPITAL DE LA MUJER

PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES DEL FACTOR V DE LEIDEN, DEL GEN DE LA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA E INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO, DE LA COAGULACIÓN EN MUJERES CON PÉRDIDA GESTACIONAL RECURRENTE, ATENDIDAS EN EL HOSPITAL DE LA MUJER DE ENERO DE 2017 A DICIEMBRE DE 2018

A handwritten signature in blue ink, corresponding to Dr. Leopoldo Cesar Serrano Diaz.

Dr. Leopoldo Cesar Serrano Diaz  
Director

A handwritten signature in blue ink, corresponding to Dra. Martha Hernández Muñoz.

Dra. Martha Hernández Muñoz  
Jefe de Enseñanza e Investigación

A handwritten signature in blue ink, corresponding to Dra. María del Consuelo Robles Martínez.

Dra. María del Consuelo Robles Martínez  
Profesora titular de enseñanza e investigación

A handwritten signature in blue ink, corresponding to Dr. Daniel Ely Bravo Aguirre.

Dr. Daniel Ely Bravo Aguirre  
Asesor Clínico de Tesis



DRA MARTHA HERNÁNDEZ MUÑOZ

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

HOSPITAL DE LA MUJER AGUASCALIENTES

ASUNTO: Autorización para la impresión de tesis

Por medio de este conducto le enviamos un cordial saludo y hacemos de su conocimiento que la Dra. Judith Jiménez Jiménez, médico residente en el último año de la especialidad de Ginecología y Obstetricia ha entregado de manera satisfactoria su documento de tesis titulado: " Prevalencia de las mutaciones del Factor V de Leiden, del gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa MTHFR e Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI.1), de la coagulación en mujeres con pérdida gestacional recurrente, atendidas en el hospital de la mujer del ISSEA de enero de 2017 a diciembre de 2018" por lo que damos nuestra aprobación para su impresión y la continuación de sus trámites para presentar el examen de grado reglamentario.

ATENTAMENTE



Dr. Daniel Ely Bravo Aguirre  
Asesor Clínico de Tesis  
Hospital de la Mujer Aguascalientes



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES



ISSEA

SECRETARÍA DE SALUD DEL ESTADO  
DE AGUASCALIENTES

DRA MARTHA HERNÁNDEZ MUÑOZ  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN  
HOSPITAL DE LA MUJER AGUASCALIENTES

ASUNTO: Autorización para la impresión de tesis

Por medio de este conducto le enviamos un cordial saludo y hacemos de su conocimiento que la Dra. Judith Jiménez Jiménez, médico residente en el último año de la especialidad de Ginecología y Obstetricia ha entregado de manera satisfactoria su documento de tesis titulado: " Prevalencia de las mutaciones del Factor V de Leiden, del gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa MTHFR e Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI.1), de la coagulación en mujeres con pérdida gestacional recurrente, atendidas en el hospital de la mujer del ISSEA de enero de 2017 a diciembre de 2018" por lo que damos nuestra aprobación para su impresión y la continuación de sus trámites para presentar el examen de grado reglamentario.

ATENTAMENTE

  
Dr. Rafael Gutiérrez Campos  
Asesor Metodológico  
Universidad Autónoma de Aguascalientes

  
Lic. En Biotecnología Eli Daniel  
García Martínez  
Asesor Metodológico  
Universidad Autónoma de Aguascalientes



UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE AGUASCALIENTES

JUDITH JIMÉNEZ JIMÉNEZ  
ESPECIALIDAD EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA  
P R E S E N T E

Por medio de la presente se le informa que en cumplimiento de lo establecido en el Reglamento General de Docencia en el Capítulo XVI y una vez que su trabajo de tesis titulado:

**“PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES DEL FACTOR V DE LEIDEN, DEL GEN DE LA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA E INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO, DE LA COAGULACIÓN EN MUJERES CON PÉRDIDA GESTACIONAL RECURRENTE, ATENDIDAS EN EL HOSPITAL DE LA MUJER DE ENERO 2017 A DICIEMBRE DE 2018”**

Ha sido revisado y aprobado por su tutor y consejo académico, se autoriza continuar con los trámites de titulación para obtener el grado de:  
**Especialista en Ginecología y Obstetricia**

Sin otro particular por el momento me despido enviando a usted un cordial saludo.

**ATENTAMENTE  
“SE LUMEN PROFERRE”**

Aguascalientes, Ags., 7 de Diciembre de 2018.

**DR. JORGE PRIETO MACÍAS  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

c.c.p. M. en C. E. A. Imelda Jiménez García / Jefa del Departamento de Control Escolar  
c.c.p. Archivo



## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios por guiarme y acompañarme en cada paso de mi carrera y permitirme concluir esta etapa maravillosa de mi vida profesional.

A mis padres Chelo Jiménez y Miguel Jiménez por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mi y en mis expectativas, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; porque mis logros se los debo a ustedes, gracias por motivarme y acompañarme durante este camino, los amo con todo mi corazón y alma.

A mis hermanos Edgardo, Gilda, Jimena y en especial Jacob, por siempre estar ahí y darme alegría en cada posguardia, a mi amor Osel Jiménez por sus consejos y apoyo incondicional, y sobre todo su paciencia, Te amo.

A los médicos adscritos de este hospital, lo cuales pusieron los cimientos de mi desarrollo, a todos y cada uno de ustedes; mis maestros que han destinado tiempo para enseñarme cosas nuevas, por brindarme aportes invaluable que servirán para toda mi vida.

GRACIAS INFINITAS.

ÍNDICE

MARCO TEÓRICO..... 1

    Marco histórico .....5

    Marco científico .....6

    Marco normativo.....8

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....9

    Justificación .....9

    Planteamiento del problema..... 10

    Pregunta de investigación ..... 11

HIPÓTESIS..... 11

    Hipótesis alterna Ha: ..... 11

    Hipótesis nula Ho:..... 11

OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN ..... 11

    Objetivo general..... 11

    Objetivos específicos ..... 12

MATERIAL, PACIENTES Y METÓDOS ..... 12

    Diseño del proyecto ..... 12

        Tipo de estudio:..... 12

        Tiempo y lugar de estudio:..... 12

        Población de estudio: ..... 13

        Variables para realización del estudio: ..... 13

        Operación de variables:..... 13

        Criterios de selección: ..... 16

        Estrategia de muestreo ..... 17

        Proceso y presentación de la información: ..... 18

RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN:.....	19
Instrumento: .....	19
Logística:.....	20
Obtención de muestras: .....	20
Procedimiento de laboratorio .....	20
Factor V de Leiden.....	20
Metilendetrahidrofolato reductasa (MTHFR) .....	21
Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI 1).....	24
RECURSOS PARA EL ESTUDIO .....	27
Humanos .....	27
Materiales.....	27
Financieros .....	27
CONSIDERACIONES BIOÉTICAS .....	28
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	29
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÓN .....	38
CONCLUSIÓN.....	42
BIBLIOGRAFÍA .....	43
ANEXOS .....	47
Consentimiento informado.....	47
Ficha de recolección de datos .....	48

ÍNDICE DE GRÁFICAS

TABLA 1. Estadísticas descriptivas y evaluación de independencia .....311

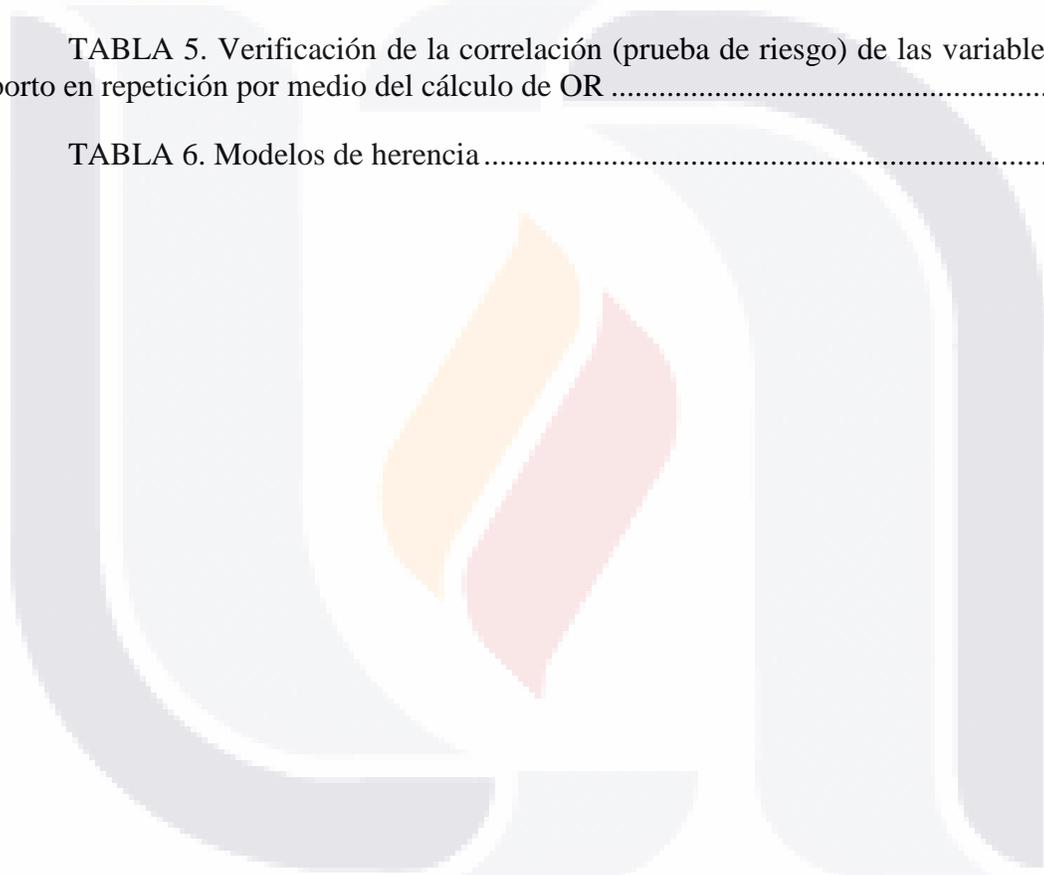
TABLA 2. Frecuencias génicas .....322

TABLA 3. Frecuencias alélicas.....333

TABLA 4. Comparación entre frecuencias observadas y esperadas, de acuerdo al modelo de Hardy- Weinberg.....34

TABLA 5. Verificación de la correlación (prueba de riesgo) de las variables con el aborto en repetición por medio del cálculo de OR .....355

TABLA 6. Modelos de herencia .....46



## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** Las trombofilias, son una tendencia genética a padecer eventos trombóticos, clínicamente evidente, a edades tempranas, con recidivas frecuentes, y sin causa aparente. En años recientes las trombofilias han ganado un lugar primario como factor de riesgo de anomalías en el embarazo, debido a que los resultados de diversos estudios han mostrado datos que sugieren una estrecha relación entre las trombofilias y la pérdida gestacional recurrente.

**OBJETIVO GENERAL:** Determinar la prevalencia de mutaciones del factor V de Leiden, Metilentetrahidrofolato reductasa (polimorfismos CT y TT) e Inhibidor del activador del plasminógeno, en pacientes atendidas en el Hospital de la Mujer con pérdidas fetales recurrentes.

**METODOLOGÍA:** Se realizó un estudio prospectivo, observacional, experimental, transversal de casos y controles, con mujeres con pérdida gestacional recurrente atendidas en el servicio de Ginecología y Obstetricia en el Hospital de la Mujer, se analizaron 80 muestras, 36 casos y 44 controles, un periodo de enero de 2017 a diciembre de 2018.

**RESULTADOS:** Existe relación entre mutaciones del factor V de Leiden, del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) e Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI 1) con pérdida gestacional recurrente, pero no existe combinación de mutaciones entre ellos, la probabilidad de riesgo de presentar aborto de repetición se eleva 1.73 veces en cada embarazo.

**CONCLUSIONES:** De acuerdo a los resultados de esta investigación si está indicado incluir a las trombofilias (FVL, MTHFR, PAI-1) en protocolo de estudio de pérdida gestacional.

**PALABRAS CLAVE:** Pérdida gestacional recurrente, factor V Leiden, Inhibidor del activador del plasminógeno, Metilentetrahidrofolato reductasa.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Thrombophilias are a genetic tendency to suffer thrombotic events, clinically evident, at early ages, with frequent recurrences, and without apparent cause. In recent years, thrombophilias have gained a primary place as a risk factor for anomalies in pregnancy, because the results of various studies have shown data that suggest a close relationship between thrombophilias and recurrent gestational loss.

**GENERAL OBJECTIVE:** To determine the prevalence of mutations of factor V Leiden, Methylenetetrahydrofolate reductase (CT and TT polymorphisms) and Plasminogen Activator Inhibitor, in patients treated at the Women's Hospital with recurrent fetal losses.

**METHODOLOGY:** A prospective, observational, experimental, cross-sectional study of cases and controls was carried out with women with recurrent gestational loss seen in the gynecology and obstetrics service at the Women's Hospital, a total of 80 samples were analyzed, which 36 are cases and 44 controls, a period from January 2017 to December 2018.

**RESULTS:** There is a relationship between mutations of factor V Leiden, the gene of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and inhibitor of plasminogen activator (PAI 1) with recurrent gestational loss, but there is no combination of mutations between them, the probability of risk of presenting a repeat abortion is 1.73 times higher in each pregnancy.

**CONCLUSIONS:** According to the results of this investigation, it is indicated to include thrombophilias (FVL, MTHFR, PAI-1) within the study protocol of recurrent gestational loss.

**KEYWORDS:** Recurrent gestational loss, thrombosis, factor V Leiden, plasminogen activator inhibitor, methylenetetrahydrofolate.

## MARCO TEÓRICO.

De acuerdo con la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) la pérdida gestacional recurrente es la consecutiva de tres embarazos antes de las 20 semanas, porcentaje que corresponde al 2% de todos los embarazos. La sociedad Americana de Inmunología de la Reproducción define como 2 pérdidas consecutivas, que representan el 5% de todos los embarazos.<sup>1,2</sup>

El estudio de las trombofilias y su repercusión en las pacientes con pérdida gestacional recurrente ha demostrado que son las responsables incluso de 60% de las pérdidas gestacionales recurrentes de origen inexplicable. Las trombofilias son consecuencia de los cambios polimórficos en genes que codifican factores de coagulación y que predisponen a un estado procoagulante en la circulación uteroplacentaria o de antifibrinólisis, ambos predisponen a mayor riesgo de pérdida gestacional.<sup>3,4</sup>

Existen dos tipos de trombofilias: adquiridas y hereditarias. En el primer grupo el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF), es la causa más común de trombofilias adquiridas, y la mayor correlación con la pérdida gestacional recurrente y complicaciones del embarazo.<sup>5,2</sup>

Las trombofilias hereditarias se definen, según el consejo conjunto de la OMS y la International Society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH), como una tendencia genética a eventos trombóticos que son clínicamente evidente a edades tempranas, con recidivas frecuentes sin causa aparente.<sup>2,6</sup>. Entre ellas se encuentra el factor V (FV) Leiden, la protrombina G 20210A, la metilendetrahidrofolato reductasa C677T, la deficiencia de los anticoagulantes naturales antitrombina III (AT-III), proteína C (PC) y proteína S (PS), las disfibrinogenemias y la homocistinuria.<sup>7</sup>

La frecuencia de estas condiciones es variable, depende de la población estudiada y de la trombofilia que se busca. En forma colectiva están presentes aproximadamente en el 15% de la población europea; siendo en los países occidentales la resistencia a la proteína C activada debida a la mutación del Factor V, la causa más frecuente de trombosis<sup>8</sup>.

La hipercoagulabilidad ya se había señalado por Virchow en el siglo XIX, como el tercer elemento de la triada de la trombosis venosa: daño de la pared vascular, estasis y cambios en la composición de la sangre<sup>7</sup>.

La proteína C de la coagulación es una glicoproteína dependiente de vitamina K, sintetizada en el hígado, con una potente actividad anticoagulante. La PC debe ser activada por la trombina para convertirse en PCa; esta activación es más eficiente en presencia de trombomodulina y requiere la PS como cofactor no enzimático. Durante la hemostasia normal la PCa hidroliza el factor V activado (FVa) y el factor VIII activado, lo que lleva a la inactivación de estos<sup>9</sup>.

Por su parte el FV de la coagulación es una molécula glicoproteica, sintetizada principalmente en el hígado, pero que también se encuentra en plaquetas, monocitos y células epiteliales; al convertirse en FVa, participa en la activación de la protrombina, haciendo parte del complejo protrombinasa<sup>7</sup>.

En 1994, Bertina y cols<sup>10</sup>, descubrieron que más del 80% de los casos de resistencia a la PCa se debe a una sustitución del nucleótido guanina (G) por la adenina (A) en la posición 1691 del gen de FV; como consecuencia la proteína del FV sufre un cambio del aminoácido arginina (R) por glutamina (Q) en la posición 506. Por lo anterior, esta mutación puede denominarse FV G1691A o FV R506Q, aunque comúnmente es llamada FV Leiden en honor a la ciudad de Leiden (Holanda) donde se descubrió.

Normalmente el FVa se inactiva mediante un corte en la posición arginina 506, seguido de un segundo corte en la posición arginina 306. En el caso de la mutación FV Leiden, solo existe hidrolisis en la posición arginina 306, lo que conduce a que el corte realizado por la PCa sea 10 veces más lento (resistencia a la PCa), con la consiguiente mayor permanencia del FV en la circulación<sup>10</sup>.

El FV Leiden es la anormalidad molecular más comúnmente diagnosticada en el laboratorio a los pacientes con trombosis venosa<sup>11</sup>, con una prevalencia de 3% en la población general, 20% en pacientes consecutivos y 45% en pacientes con historia familiar de trombosis<sup>10</sup>.

Por su parte el inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) es una glicoproteína compuesta por 379 aminoácidos y con peso molecular de 48 kDa, y es considerada como el principal inhibidor de la fibrinólisis. Cuando las plaquetas son estimuladas por trombina, el PAI-1 es liberado sobre la superficie de las plaquetas, protegiendo el coágulo de una lisis prematura. Este mecanismo causa un rápido incremento local de la concentración de PAI-1 en circulación, el cual se une rápidamente a tPA y a uPA, evitando que el plasminógeno se convierta en plasmina, inhibiendo así la fibrinólisis.

Durante la agregación plaquetaria se produce un marcado aumento de los niveles de PAI-1<sup>12</sup>, el que puede encontrarse bajo tres formas moleculares: latente, activa y formando complejos con los activadores. El PAI-1 está en forma latente en las plaquetas, pudiendo ser reactivado in vivo. La interacción del PAI-1 con los activadores tiene lugar a través de la formación de un complejo a nivel del centro reactivo Arg346-Met347, con liberación de un péptido intermedio<sup>13</sup>.

En cuanto a su papel fisiopatológico se han observado cifras elevadas de PAI-1 en situaciones clínicas relacionadas con fenómenos trombóticos<sup>12</sup>, mientras que varios miembros de familias con déficit de PAI-1 presentaron una moderada o severa sintomatología hemorrágica<sup>14</sup>.

El gen humano de PAI-1 se encuentra en el cromosoma 7q21.3-q22, a partir de la cuales se han descrito sus correspondientes polimorfismos<sup>15</sup>. Este polimorfismo (4G/5G) está definido por la inserción/delección de un nucleótido “guanina” (G) localizado en la región promotora, 675 pares de base “río arriba” del sitio de transcripción teniendo una secuencia de 4 o 5 nucleótidos de guanina el cual muestra una importante funcionalidad, ya que en los casos donde está presente el alelo 4G o el genotipo 4G/4G se ha observado un aumento en la actividad sérica de PAI 1<sup>15</sup>. Con todo lo detallado anteriormente, podemos inferir que el análisis del polimorfismo para PAI-1 nos indicaría los niveles séricos de la proteína y si existe o no un riesgo asociado a la alteración de la hemostasia.

Y por último es importante mencionar que la MTHFR es una enzima que cataliza la conversión del 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-MTHF) a 5-Metil-THF, el cual es el

donador de unidades de carbono que son utilizadas en la síntesis de la metionina a partir de la homocisteína, mutación del ADN, entre otras.

La mutación más común de la MTHFR es una sustitución de la citosina por la timina en la base 677, la mutación C677T<sup>8</sup>. Este cambio conduce a alteraciones en la función enzimática que se reflejan en una menor estabilidad de la proteína<sup>16</sup>. La mutación es de naturaleza autosómica recesiva; la MTHFR de individuos que son homocigotos para esta mutación, los T/T, presenta una baja actividad específica y una estabilidad reducida In Vitro, esta enzima es denominada MTHFR “termolábil” y cuando existe un déficit de folato se asocia a un aumento de los valores de homocisteína (hiperhomocisteinemia), a una alteración en el balance plasmático de algunos metabolitos del folato<sup>17</sup> a una mayor incidencia de episodios trombóticos<sup>8</sup>. En 1998, fue descubierto un segundo polimorfismo en la MTHFR que implica la sustitución de A por C en el par de bases 1298<sup>18</sup>, que origina la sustitución de ácido glutámico por alanina con una frecuencia de alelos semejante a la descrita para la mutación C677T. Sin embargo, el polimorfismo A1298C no se asocia con la elevación plasmática de homocisteína como sucede con el polimorfismo C677T de la MTHFR, pero la mutación A1298C ha sido relacionada con una disminución del riesgo de leucemia linfoblástica aguda en adultos y niños<sup>19,20</sup> y en combinación con la mutación C677T se ha observado una disminución entre 2.5-3 veces el riesgo de sufrir esta patología en niños<sup>21</sup>.

Con lo anterior, es posible observar que estas mutaciones pueden intervenir en varios procesos dentro del organismo como el cáncer, la probabilidad de sufrir algún evento trombótico y poder aplicarlo también al área de medicina reproductiva y ginecología que aún se encuentra en etapa de estudio, ya que se está analizando el efecto de estas mutaciones en casos de retardo del crecimiento fetal, abortos espontáneos y la ineficacia de tratamientos de fertilización asistida.

## MARCO HISTÓRICO

Las primeras descripciones por los hematólogos sobre la relación de una prueba de coagulación con complicaciones obstétricas llevan ya más de 30 años. Nilsson y col,<sup>22</sup> describieron en 1975 la asociación de muertes fetales intrauterinas con la presencia de un anticoagulante circulante que llamaron anti tromboplastina. Se postuló entonces que los abortos y otras complicaciones obstétricas podrían ser más una expresión de la tendencia trombotica. En las placentas de las pacientes se observó la presencia de infartos extensos, necrosis fibrinoide, ateromatosis aguda y trombos intramurales a nivel de las arterias espirales. Como consecuencia de la lesión vascular había alteración del flujo placentario y daño fetal<sup>23,24</sup>. Muchas de estas mujeres habían tenido también como manifestación clínica una trombosis venosa. Esta asociación de una trombosis y/o una complicación obstétrica con una alteración de laboratorio, que es la presencia de anticuerpos antifosfolípidos, se define por primera vez en 1983 como Síndrome Antifosfolípidos (SAF)<sup>25</sup>.

Hasta ese momento la trombosis era la base fisiopatológica que explicaba las complicaciones obstétricas y los abortos recurrentes. Esta fue la hipótesis inicial sobre la cual se basaron para intentar los primeros tratamientos con heparina en mujeres con anticuerpos antifosfolípidos. Fue Rosove y col.<sup>26</sup>, quienes reportaron varios casos de tratamiento con heparina no fraccionada (HNF) en 1990.

El término de trombofilia lo introduce O. Egeberg en 1965, cuando se descubre la antitrombina y lo hacen en su trabajo titulado: Trombofilia causada por una deficiencia de antitrombina sanguínea<sup>27</sup>. Luego se descubren otras trombofilias hereditarias como la deficiencia de la Proteína S y Proteína C.

En 1994 se descubre el factor V de Leiden (FVL) y dos años después la mutación en el gen de la protrombina G20210A (PTG20210A). Es importante destacar que el término trombofilia fue utilizado para relacionar el incremento del riesgo trombotico venoso asociado a la deficiencia o mutación de un componente sanguíneo. Estas mutaciones genéticas se conocen con el medio del desarrollo del proyecto del genoma humano (PGH) que se inauguró en el año 1990 y se completó en 2000.

Esto se ve con más claridad en los últimos años. Sin embargo, en los noventa el entusiasmo por el descubrimiento de varios polimorfismos protrombóticos sumando a los antecedentes de los hallazgos en el SAF obstétrico y la falta de respuesta médica a las complicaciones obstétricas, hizo que se empezara a relacionar o a buscar la asociación de las trombofilias hereditarias con las pérdidas recurrentes del embarazo y la patología vacuoloplacentaria. Comienzan a surgir datos epidemiológicos como los trabajos de Kupfermie y cols<sup>27</sup> en 1999 y Pretson y cols,<sup>28,29</sup> en 1994 y 1996.

Los estudios iniciales retrospectivos, sobreestimando el nivel de riesgo, mostraron una asociación entre trombofilia hereditaria, muerte fetal y preeclampsia con criterios de severidad, que no es confirmada en estudios recientes<sup>30</sup>.

## MARCO CIENTÍFICO

La pérdida gestacional es una alteración que afecta del 12% al 15% de las parejas en edad reproductiva, y es recurrente en el 1% al 2% de ellas<sup>7</sup> lo que se denomina pérdida gestacional recurrente (PGR). Las trombofilias heredadas y adquiridas son una de las causas aceptadas de PGR<sup>31</sup>.

Los eventos trombóticos en la interfase materno fetal se han asociado a la fisiopatología de PGR. En un estudio de Dizon-Townson y cols,<sup>24</sup> en pacientes con complicaciones obstétricas, se encontró que un 42% de las pacientes positivas para FV Leiden tenían infartos mayores del 10%.

Brenner y cols<sup>7</sup>, estudiaron mujeres con PGR sin causa aparente, y encontraron que el 49% tenían al menos una de las tres trombofilias heredadas más comunes en individuos caucásicos: FV Leiden, Protrombina G20210A o MTHFR C677T. En el grupo control la frecuencia de estas trombofilias fue de 24%. Además, otro estudio realizado por Brenner<sup>7</sup>, en 76 pacientes con PGR, muestra que el 8% tenían combinación de mutaciones y solo el

0.9% de los controles; el estudio EPCOT (European Prospective Cohort on Thrombophilia) calculó entre los grupos de individuos mencionados, una razón de disparidad (RD) de 14.3<sup>7</sup>.

Varios estudios en mujeres con PGR asociados a trombofilia y sus respectivos controles, muestran asociación entre PGR y FV Leiden. En el de Grandone y cols, el grupo de pacientes casos tenía una frecuencia de 16% comparada con 4% en el grupo control (RD 4.4); en el de Brenner y cols 32% y 10% respectivamente para los mismos grupos (RD 4.0), y en el de Ridker y cols, reportaron 8% en pacientes y 3.7 % en controles (RD2.3)<sup>7</sup>.

Es importante resaltar entre todas las trombofilias heredadas, al FV Leiden como el de mayor frecuencia e importancia en lo que a pérdidas gestacionales se refiere.

La mutación de la protrombina se evaluó recientemente en varios estudios que compararon mujeres con PGR y un grupo control; Foja y cols en 80 pacientes y 100 controles, encontraron una prevalencia de 9% y 2% respectivamente (RD 4.6,  $p=0.038$ ). Por su parte, Deitcher y cols no encontraron asociación estadísticamente significativa al estudiar 50 pacientes con PGR, del primer trimestre y observar la mutación solo en una paciente, 2% (RD 2.2,  $p=0.23$ ). Brenner encontró 7.2% de pacientes y 3.2% de los controles con la mutación (riesgo relativo 1.95,  $p=0.22$ ). A pesar de estos estudios contradictorios en la asociación de PGR con protrombina G20210A, la situación cambia cuando se asocia la mutación de la protrombina con el FV Leiden, donde se cuadruplica el riesgo de PGR (RD 4.6,  $p=0.001$ )<sup>7</sup>.

Las mujeres gestantes normales tienen niveles plasmáticos más bajos de homocisteína que las no embarazadas; sin embargo, cuando coexisten deficiencias de los cofactores necesarios para el metabolismo de este aminoácido (especialmente el ácido fólico), y la mutación MTHFR C677T, se puede presentar hiperhomocisteinemia leve o moderada.<sup>7,32</sup>

A pesar de los hallazgos mencionados, varios estudios han fracasado en el intento de asociar la condición de homocigocidad para la variante termolábil de la MTHFR con PGR, pero en otros se muestra evidencia de una posible asociación<sup>7,33</sup>.

## MARCO NORMATIVO

Según la Norma Oficial Mexicana para la atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio y del recién nacido NOM-007-SSA2-2010, se define aborto como la expulsión del producto de la concepción de menos de 500 gramos de peso y/o menos de 22 semanas completas de gestación.

En el Artículo 43 se establecen principios básicos respecto al uso del consentimiento informado, sin llegar a hacer una adecuada distinción entre consentimientos médico y de investigación, en donde este último podría ser aplicado a los Biobancos.

En términos generales el consentimiento informado, en México se ha utilizado más para proteger a los pacientes, que, a causas de investigación, lo que refleja la ausencia de una política integral para estos fines.

En el Artículo 13 se establece que en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio y respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar, sin embargo, las leyes mexicanas son inconsistentes en cuestión de protección a la información y resultados obtenidos durante una investigación.

La Norma Oficial Mexicana NOM- 012-SSA3-2012 que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos, la cual nos habla sobre la investigación científica, clínica, biomédica, tecnológica y biopsicosocial en el ámbito de la salud, los cuales son factores determinantes para mejorar las acciones encaminadas a proteger, promover y restaurar la salud del individuo y de la sociedad en general, por lo que resulta imprescindible orientar su desarrollo en materias específicas y regular su ejecución en los seres humanos, de la manera que la garantía del cuidado de los aspectos éticos, del bienestar e integridad física de la persona que participa en un proyecto o protocolo de investigación y del respeto a su dignidad, se constituyan en la regla de conducta para todo investigador en área de la salud.

Dentro del Hospital de la Mujer de Aguascalientes se cuenta con un comité de Bioética, el cual es obligatorio en toda institución y hospital. Este comité Hospitalario de Bioética realiza

funciones para la resolución de los problemas derivados de la atención médica a que se refiere el artículo 33, así como para el análisis, discusión y apoyo en la toma de decisiones respecto a los problemas bioéticos que se presentan en la práctica clínica o en la docencia impartida en el área de salud, así como promover la elaboración de lineamientos y guías éticas institucionales para la atención y la docencia médica. Asimismo, promueve la educación bioética permanentemente de sus miembros y del personal del establecimiento.

Debido a que la información obtenida es personal y especialmente sensible, debe ser protegida mediante códigos encriptados a los cuales deben tener acceso únicamente personal e investigadores autorizados bajo condiciones estrictas.

## **JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **JUSTIFICACIÓN**

Hoy en día el uso temprano de recursos tecnológicos ayuda al médico a estudiar a pacientes con pérdida gestacional recurrente. Los exámenes de primer nivel en el estudio de la pareja con pérdida gestacional recurrente tienen el propósito de identificar los procesos que afectan la fisiología y anatomía normal reproductiva. Con esos estudios se consigue determinar el 80% de las causas de la pérdida del embarazo; el diagnóstico preciso permite indicar el tratamiento específico. Hasta hace poco 20% de los casos eran de origen inexplicable; sin embargo, debido a la adquisición de nuevas tecnologías este porcentaje se ha reducido incluso a 2-5%. Las pruebas inmunológicas y determinación de genes de trombofilias permiten diagnosticar entre 15 y 18% de los casos.

El estudio de las trombofilias y su repercusión en las pacientes con pérdida gestacional recurrente ha demostrado que son las responsables incluso de 60% de las pérdidas gestacionales recurrentes de origen inexplicable.

La séptima edición del Consenso de la American College of Chest Physicians (ACCP), incorpora la sugerencia de estudiar la trombofilia hereditaria en mujeres con 3 o más pérdidas

recurrentes del primer trimestre y/ o una o más del segundo trimestre o si existen antecedentes de complicaciones obstétricas (preeclampsia con criterios de severidad, restricción de crecimiento intrauterino, abrupto placentario, muerte intrauterina de causa desconocida), es por ello la importancia de este protocolo de estudio, ya que podría ser aceptada la idea de realiza un tamizaje de trombofilias como estudio de rutina en pacientes con pérdida gestacional recurrente, con el fin de prevenir complicaciones y/ o tratar precozmente la patología de base, reflejado en un adecuado bienestar de binomio.

#### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Hospital de la Mujer de Aguascalientes pertenece al Instituto de Salud del estado de Aguascalientes, es un hospital de segundo nivel, enfocado exclusivamente a la atención médica en el área de Ginecología y Obstetricia, así como neonatología. Atiene a la población en general, con un predominio de pacientes afiliadas al seguro popular y población sin seguridad social, en su mayoría pertenecientes a un estrato social y económico medio-bajo. En este hospital se atienden alrededor de 10 000 eventos obstétricos cada año, aunado a ello se otorga el servicio de consulta externa de embarazo de bajo riesgo, así como de alto riesgo el cual representa un 10% de los embarazos atendidos en el Hospital de la Mujer.

El manejo de mujeres con historia clínica de pérdidas recurrentes del embarazo, y otras complicaciones obstétricas relacionados con trombofilias, como lo es muerte fetal intrauterina, preeclampsia con criterios severidad, restricción del crecimiento intrauterino, y desprendimiento prematuro de placenta normoinserta es un desafío para el área obstétrica del Hospital de la Mujer, debido a los escasos estudios de investigación en nuestro hospital. Se suma a su vez la fuerte carga emocional de la paciente y familiares a estas complicaciones quien demanda una respuesta al profesional, es por ello la necesidad de realizar esta investigación para conocer las estadísticas, y proponer estrategias de prevención y tratamiento oportuno.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la prevalencia de mutaciones del factor V de Leiden G1691A, Metilentetrahidrofolato reductasa MTHFR (polimorfismos CT y TT) e Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI 1), en pacientes atendidas en el Hospital de la Mujer de Aguascalientes que presenten pérdidas fetales recurrentes?

## HIPÓTESIS

HIPÓTESIS ALTERNA Ha:

Existe relación entre mutaciones del factor V de Leiden G1691A, Metilentetrahidrofolato reductasa MTHFR (polimorfismos CT y TT) e Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI 1), y pérdida gestacional recurrente.

HIPÓTESIS NULA Ho:

No existe relación entre mutaciones del factor V de Leiden G1691A, Metilentetrahidrofolato reductasa MTHFR (polimorfismos CT y TT) Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI 1), y pérdida gestacional recurrente.

## OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

### OBJETIVO GENERAL

- Determinar la prevalencia de mutaciones del factor V de Leiden G1691A, MTHFR Metilentetrahidrofolato reductasa (polimorfismos CT y TT) e Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI 1), en pacientes atendidas en el Hospital de la Mujer de Aguascalientes que presenten pérdidas fetales recurrentes.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer las características socio-demográficas de las pacientes que presentan pérdida gestacional recurrente en el Estado de Aguascalientes.
- Determinar si las pacientes estudiadas presentan combinación de mutaciones.
- Determinar si la prevalencia de las mutaciones del factor V de Leiden, gen de la metilentetrahidrofolato reductasa, e Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI 1), en el grupo de estudio seleccionado es similar, mayor o menor que la reportada para otros grupos en diferentes partes del mundo.
- Definir si la prevalencia de mutaciones del factor V de Leiden, gen de la metilentetrahidrofolato reductasa e Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI 1), en este grupo de pacientes permitiría establecer estudios de asociación futuros con enfoque monogénico o multigénico.

## MATERIAL, PACIENTES Y METÓDOS

### DISEÑO DEL PROYECTO

**TIPO DE ESTUDIO:** Prospectivo, experimental, transversal, de casos y controles (Estudio de prevalencia y análisis molecular).

**TIEMPO Y LUGAR DE ESTUDIO:** Periodo de enero de 2017 a diciembre de 2018 en el servicio de Gineco- Obstetricia del Hospital de la Mujer ISSEA de la ciudad de Aguascalientes.

**POBLACIÓN DE ESTUDIO:** Se realizó en mujeres con pérdidas fetales recurrentes atendidas en el servicio de Gineco Obstetricia del Hospital de la Mujer ISSEA. Para el grupo control se realizó en el mismo lugar y con antecedente de 2 embarazos normoevolutivos. Se analizaron un total de 80 muestras, de las cuales 36 muestras son problemas y 44 muestras controles.

**VARIABLES PARA REALIZACIÓN DEL ESTUDIO:** Son variables cualitativas discretas y continuas; así como cualitativas nominales.

**OPERACIÓN DE VARIABLES:** Definición de variables y unidades de medición.

Variable	Definición operacional	Tipo y característica de la variable	Unidad de medición
Edad	Espacio de tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el día del evento obstétrico.	Cuantitativa Continua	Años
	Número de ocasiones que ha estado ocupado útero por producto		Número

Número de gestación	de la gestación hasta el día del evento obstétrico.	Cuantitativa Discreta	Ordinal
Número de abortos	Número de ocasiones que se ha interrumpido la gestación, antes de la semana 22 de gestación y/o peso menor a 500 gramos.	Cuantitativa Discreta	Número ordinal
Edad gestacional	Tiempo que ha transcurrido desde la concepción hasta el día del evento obstétrico.	Cuantitativa Continua	Número
Número de partos	Número de gestaciones, de productos mayores de 20 semanas de gestación y/o peso mayor a 500 gramos.	Cuantitativa Discreta	Número
Ingesta de medicamentos en el embarazo	Consumo de fármacos desde la concepción hasta el día de la	Cualitativa Nominal	SI NO

	interrupción de embarazo.		
Antecedente de trombosis	Antecedente personal de incremento en la tendencia a la formación de coágulos.	Cualitativa Nominal	SI NO
Presencia de comorbilidades	Diagnóstico personal establecido de alguna enfermedad.	Cualitativa Nominal	SI NO
Enfermedad autoinmune	Antecedente personal de presencia de enfermedad de origen autoinmune.	Cualitativa Nominal	SI NO
Historia de infertilidad	Antecedente personal de dificultad para concebir.	Cualitativa Nominal	SI NO
Antecedentes familiares de DM	Familiares de primer grado con Diabetes Mellitus.	Cualitativa Nominal	SI NO

Antecedentes familiares de trombosis	Familiares de primer grado con incremento en la tendencia a la formación de coágulos.	Cualitativa Nominal	SI NO
Antecedentes familiares de enfermedad venosa	Familiares de primer grado con lesión en la pared vascular de venas.	Cualitativa Nominal	SI NO
Mutación del gen MTHF	Existencia de mutación del gen MTHFR.	Cualitativa Nominal	SI NO
Mutación del factor V Leiden	Existencia de mutación del factor V Leiden.	Cualitativa Nominal	SI NO
Presencia de polimorfismo en PAI-1	Expresión de polimorfismo en PAI-1 determinados por digestión enzimática.	Cualitativa Nominal	SI NO

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

a) Criterios de inclusión para grupo problema son los siguientes:

- Pacientes con diagnóstico de aborto diferido en evolución o incompleto, antes de las 22 semanas de gestación, y/o peso menor a 500 gramos.

- Paciente con historia de dos o más abortos.

- Paciente con diagnóstico clínico y/o ultrasonográfico de muerte fetal.

- Paciente con firma recabada en hoja de Consentimiento informado.

b) Criterios de inclusión para grupo testigo:

-Mujeres sanas con embarazos estables y que hayan tenido previamente 2 o más hijos sanos.

-Ausencia de preeclampsia, aprupto placentario, enfermedad autoinmune o historia de pérdida gestacional recurrente, trombosis o de infertilidad.

c) Criterios de exclusión:

-Paciente con diagnóstico de amenaza de aborto.

- Paciente sin firma de consentimiento informado.

- Pacientes que habiendo firmado el consentimiento informado desean no participar más en el proyecto de investigación.

## ESTRATEGIA DE MUESTREO

a) Tamaño de la muestra.

El muestreo es de tipo NO probabilístico, en el que la muestra se va a calcular conforme la fórmula de proporciones, para obtener el grupo control que serán pacientes con embarazo normoevolutivo sin antecedente de pérdida gestacional recurrente y el grupo de casos son pacientes con antecedente de 2 o más abortos, empleado la siguiente formula:

$$n = \frac{N \times Z^2 \times p \times q}{n = 36}$$

$$d^2 \times (N - 1) + Z^2 \times q \times q$$

Donde:

N = Tamaño de la población = 2000

Z = Nivel de confianza = 95%

P = Probabilidad de éxito, o proporción esperada = 93%

Q = Probabilidad de fracaso = 7 %

D = Precisión (Error máximo admisible en términos de proporción) = 7 %.

#### PROCESO Y PRESENTACIÓN DE LA INFORMACIÓN:

a) Estadística descriptiva

- La información sobre datos clínicos fue almacenada y analizada en Microsoft Excel, relacionando la muestra con número de expediente, y vaciando la información clínica obtenida en los cuestionarios, con las variables descritas anteriormente. Asimismo, en una hoja aparte, se registró los resultados de laboratorio posterior al procesamiento de muestras,

registrando la cantidad de ADN obtenido por muestra y los resultados individuales de las pruebas realizadas como positivo/negativo: integridad, control, amplificación de cada gen y genotipo.

- Estadística descriptiva de los datos clínicos, empleando en su debido caso medias, moda y mediana; o proporciones dependiendo de la variable, con ayuda de funciones en el programa Microsoft Excel y Minitab.

- Construcción de una tabla de contingencia 2x3, y posteriormente el cálculo de OR mediante fórmulas específicas y/o regresión logística.

- Prueba de chi cuadrada para determinar la independencia de los modelos (diferencias o no entre casos y controles)

- La comparación de frecuencias génicas y alélicas se realizará a partir de los resultados de la tabla de contingencia, y comparando con las relaciones propuestas por el modelo de Hardy-Weinberg.

### **RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN:**

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación y Docencia del Hospital de la Mujer de Aguascalientes, y realizado de acuerdo a las normas éticas de la declaración de Helsinki 1975 y las normativas nacionales vigentes.

**INSTRUMENTO:** Hoja de captura que registra los datos de la paciente, obtenidos por interrogatorio directo (Anexo 1). Se elabora tabla con las variables a estudiar para registrar los datos y resultados obtenidos.

**LOGÍSTICA:** Las pacientes que acudieron al Servicio de Admisión al Hospital de la Mujer en el período de enero de 2017 a diciembre de 2018 con diagnóstico de aborto o muerte fetal, así como historia de 2 embarazos normoevolutivos, se canalizaron al área de labor del servicio de tococirugía para su manejo. A las que cumplieron con criterios de inclusión y sin modificar el manejo establecido en el protocolo de atención institucional, el médico residente o médico interno de pregrado al cargo de su atención, la invitó a participar en el estudio. Las pacientes que aceptaron, se les recabó su firma de conformidad en “Formato de Consentimiento Informado” y se les realizó una encuesta con los datos requeridos.

**OBTENCIÓN DE MUESTRAS:** El personal médico en turno, tomó una muestra de sangre de 3ml en un tubo con EDTA para su posterior determinación de pruebas moleculares. Las muestras obtenidas se conservaron a 4°C, hasta su traslado al laboratorio de Ingeniería Genética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Al ser recibidas, 24 horas después, las muestras se registraron en la bitácora de laboratorio con los datos de fecha, grupo y número consecutivo de muestra.

## PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO

### FACTOR V DE LEIDEN

**Extracción:** El ADN se extrajo de leucocitos de sangre periférica usando el kit de extracción Blood DNA Preparation de Jena Bioscience. Para la amplificación se utilizaron dos métodos: uno propuesto por Bertina et al., 1994. El cual brevemente, para la PCR RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism, por sus siglas en inglés), se realizó en un volumen final de 50 µL, conteniendo: amortiguador de reacción (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,8 µM de cebadores (primer 1: 5'-TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA-3' y primer 2: 5'-

TGTTATCACACTGGTGCTAA-3') 100 a 500 ng de ADN genómico, y 2.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies).

Amplificación se realizó en un termociclador (Applied Biosystem 9700): la desnaturalización inicial será a 94°C por 5 min seguido de 35 ciclos a 94°C por 20 s, 62°C por 15 s, 72°C por 40 s y la extensión final a 72°C por 10 min. La amplificación, que fue propuesta por Koksall et al, 2006. También es una PCR RFLP y se realizó de igual manera con un volumen final de 50 µL, conteniendo: amortiguador de reacción (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,8 µM de cebadores (primer 1: 5'-ACATCGCCTCTGGGCTAATA-3' y primer 2: 5'-TTGAAGGAAATGCCCCATTA-3') 100 a 500 ng de ADN genómico, y 2.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies). La amplificación se llevó a cabo en el mismo termociclador (Applied Biosystem 9700): la desnaturalización inicial será a 94°C por 5 min seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 s, 58°C por 45 s, 72°C por 1 min y la extensión final a 72°C por 10 min.

Digestión: Se utilizó la enzima de restricción Mnl1 (New England Biolabs, Beverly, MA) siguiendo el método de Bernita et al,1994 para ambos casos de amplificaciones. El producto digerido de PCR se analizó en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

#### METILENETETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR)

Extracción: Se tomaron 200 µL de cada muestra de sangre recibida y aprobada para su estudio y se colocaron por separado en un tubo Eppendorf debidamente rotulado con el folio de la muestra. A fin de aumentar el volumen inicial de procesamiento, se adicionaron además 200 µL de solución salina fisiológica (NaCl 0.9%) a cada muestra.

La extracción de ADN se llevó a cabo usando el Wizard SV Genomic Purification Kit (#TB302, Promega) adaptado para emplear muestras de sangre en lugar de cultivo celular o tejido sólido: en lugar de centrifugar las muestras para concentrar la fracción celular, se adicionó la solución de digestión (Nuclei Lysis Solution, 200 µL; EDTA 0.5 M pH 8.0, 50 µL; Proteinasa K 20 mg/mL, 20 µL; RNasa A, 5 µL) directamente a la sangre mezclada con

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

solución salina fisiológica, y se incubó en seco (termoblock) a 55 °C entre 18 y 24 horas. Transcurrido ese tiempo se centrifugó las muestras a 3000 rpm durante 2 minutos para separar componentes no digeridos. Posteriormente, a diferencia del protocolo recomendado por el fabricante, se separó el sobrenadante de los restos no digeridos y se transfirió a un tubo nuevo, donde se le adicionaron los 250 µL de Wizard SV Lysis Buffer, se mezcló y se centrifugó una vez más para separar nuevamente residuos sólidos que pudieran bloquear la columna. Ensamblando una columna de separación y un tubo colector por muestra, se transfirió los sobrenadantes a columnas individuales y se centrifugaron a 13000 rpm durante 3 minutos. Se descartó la columna con el líquido, y se procedió a realizar cuatro lavados como se indica a continuación: se añadieron 650 µL de Wizard SV Wash Solution a cada columna ensamblada en un tubo colector nuevo, se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto, y se descartó el tubo colector con el líquido de lavado.

Tras los cuatro lavados, se re-ensambló la columna en un tubo colector más, y se procedió al secado de la columna por centrifugación a 13000 rpm durante 2 minutos, seguido de reposo en la campana de extracción a fin de evaporar el etanol residual en la muestra. Finalmente, para realizar la elución del ADN, se descartó el tubo colector, ensamblando la columna en un tubo Eppendorf nuevo (debidamente rotulado) y se realizaron dos etapas como sigue: se adicionaron 75 µL de agua libre de nucleasas a 55 °C a la columna, se dejó reposar 2 minutos para hidratar debidamente el material de la columna, y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto. Concluidas las dos etapas de elución, se descartó la columna, y el ADN diluido resultante se almacenó a -20 °C hasta su cuantificación y uso.

A fin de determinar la cantidad y calidad del ADN aislado, se realizó una cuantificación espectrofotométrica tomando tres longitudes de onda (230, 260 y 280 nm) y una electroforesis en gel de agarosa. Se tomaron como aceptables las muestras obtenidas con más de 10 µg/mL de DNA y una alta integridad. El análisis control para la amplificación se llevó a cabo mediante PCR, teniendo como objetivo amplificar un fragmento del gen de la β-globina, de acuerdo al protocolo descrito por Steffens-Nakken et al. (1995), que incluyó el uso de un mix de reacción con 100 nM de oligos KM29. 5 U de Taq polimerasa (Jena Bioscience); entre 100 y 200 ng de ADN purificado; todo a un volumen final de 50 µL. El

programa del termociclador comprendió una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 min, alineamiento a 57 °C durante 1 min, y extensión a 72 °C durante 2 min; extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Las muestras fueron preservadas a 4 °C para su uso inmediato, o a -20 °C si se iban a emplear posteriormente. La verificación de la amplificación se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, a 100 V durante 70 min. Una banda de 536 bp, identificada con ayuda del marcador TrackIt™ 100 bp (Invitrogen), se interpretó como resultado positivo de la amplificación.

Genotipificación de las muestras mediante RFLP-PCR: Las muestras que amplifiquen positivamente para el fragmento del gen de la  $\beta$ -globina fueron seleccionadas para la genotipificación del gen MTHFR, empleando el protocolo de Frosst et al. (1995), pero tomando las condiciones de reacción para la PCR propuestas por Kluijtmans et al. (1996) y realizando modificaciones realizadas previamente en el laboratorio de virología e Ingeniería Genética. El protocolo resultante consistió en un mix de reacción compuesto por: 20 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM de KCl; 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> ; 200  $\mu$ M de dNTPs; 100 ng de cada oligonucleótido cebador (F: 5'-TGA AGG AGA AGG TTG TCT GCG GGA - 3'; R: 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'); 2.5 U de Taq polimerasa (Jena Bioscience); entre 100 y 200 ng de ADN purificado (de acuerdo a la cuantificación realizada); todo a un volumen final de 50  $\mu$ L. El programa establecido en el termociclador incluye una desnaturalización inicial a 96 °C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 93 °C durante 50 s, alineamiento a 55 °C durante 50 s y extensión a 72 °C durante 30 s; y una extensión final a 72 °C durante 7 min.

Las muestras fueron preservadas a 4 °C para su uso inmediato, o a -20 °C. La verificación de la amplificación se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, a 100 V durante 90 min. Una banda de 198 bp, identificada con ayuda del marcador 100 bp DNA ladder (Jena Bioscience), se interpretó como resultado positivo de la amplificación.

Todas las muestras que den un resultado positivo a la amplificación del fragmento del gen MTHFR fueron sometidas a una digestión con la enzima HinfI (Jena Bioscience), de acuerdo al protocolo previsto por el fabricante: máximo 1  $\mu$ g de producto de amplificación del gen

MTHFR; todo a un volumen final de 20  $\mu$ L. La incubación se realizó a 37 °C durante 1 h, y posteriormente la enzima fue inactivada a 80 °C durante 20 min. El producto de digestión fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, a 100 V durante 90-100 min. La correspondiente genotipificación se realizó con ayuda del marcador 100 bp DNA ladder (Jena Bioscience), de acuerdo a los hallazgos de Frosst et al. (1995):

- Genotipo CC, una única banda de 198 bp.
- Genotipo CT, presencia de dos bandas, una de 175 bp y otra de 198 bp.
- Genotipo TT, una única banda de 175 bp.

#### INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO (PAI 1)

Extracción de ADN: De todas las muestras de sangre conseguidas, se extrajo el ADN de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor (Qiagen, Co.Bet. USA) por el método “ Blood DNA preparation kit: Solution based genomic DNA purification from whole” de la empresa Jena Bioscience, a partir de 200 microlitros de sangre.

Para la extracción se rotularon los tubos Eppendorf con el número de expediente correspondiente y dependiendo de la cantidad de muestras que se fueran a someter a la extracción en el momento. Primeramente, se añadió a los tubos Eppendorf 900  $\mu$ L del Buffer Lysis Solution (la cuál genero la suspensión o la rotura de las membranas celulares de las células contenidas en la sangre, para la liberación de sus componentes intracelulares) y después 200  $\mu$ L de sangre. Se dieron 10 veces vortex y se sometió a incubación por 3-10 minutos para que el buffer pudiera entrar de manera correcta. Ya transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 13 rpm en 30 segundos. Se esperaba en este tiempo, la observación de una pastilla negra en dado caso de que no apareciera se volvía a centrifugar, pero a 1 minuto. Posteriormente, se desechó el sobrenadante con una micropipeta en un vaso de cloro y se dejó la pastilla en el tubo Eppendorf la cual se sometió a vortex (sin tiempo determinado)

para deshacer la pastilla. Una vez ya realizado dicho suceso, se añadieron 300 ul de Cell Lysis Solution y se mezcló con la pipeta para evitar la formación de coágulos.

Posteriormente, se añadió a cada tubo Eppendorf 100 ul de Protein precipitation Solution y se realizó un vortex por 20 segundos con el fin de que apareciera una pastilla negra y se centrifugo a 13 rpm por 1 minuto. Se le volvió a quitar el sobrenadante cuidando de que no se viniera la pastilla en la punta de la micropipeta. Dicho sobrenadante se trasladó a otro tubo Eppendor nuevo.

Precipitación de DNA: Se añadieron 300 ul de Isopropanol, dándose un vortex por 1 minuto y se centrifugo a 13 rpm a 1 minuto. Posteriormente se quitó el sobrenadante vigilando que la pastilla estuviera aun presente en tubo Eppendorf y se dejó secar en Etanol durante 15 minutos.

Hidratación: Se añadieron 75 ul del reactivo DNA hydratation Solution, dándose un vortex a 5 segundos y se sometió a incubación en el termoblock por 30 minutos. Finalmente, se colocaron las muestras ya extraídas con ADN en el concentrador de ADN durante 10 minutos con el fin de que como su nombre lo dice, se concentrara o se acumulara todo el ADN contenido en el mismo sitio del tubo.

A todas las muestras que se sometieron a extracción de ADN se visualizó su integridad en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % el cuál se diluyo en 100 ml de Buffer SB 1x. Todos los geles se corrieron de 100-120 volts.

Amplificación por PCR RLFP: Para la realización de la amplificación del gen PAI-1 (PCR) se utilizaron los primers: 5' CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3' (Foward) y 5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3' (Revers) de Invitrogen<sup>Tm</sup>, life technologies). La PCR se llevó a cabo en 50 uL totales. La amplificación se estandarizó en base al protocolo por Rangel, (2016). Se utilizaron las siguientes concentraciones: 36 uL de H<sub>2</sub>O, 5 uL de Buffer, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 uL de dNTPs, 3 uL de Oligonucleotidos (preparados con 10 uL de cada primers y 80uL de H<sub>2</sub>O), 1U/UL de Taq Polimerasa y 3 uL de ADN. Las condiciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial de 94°C por 3 minutos, 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, seguido de 60°C durante 30 segundos y 72°C por 1 minuto. Al final la

extensión se programó a 72 °C por 5 minutos. El fragmento obtenido de la amplificación 98-99pb (para los alelos 5G/4G) fue visualizado en una electroforesis con gel de agarosa al 1.5 %, utilizando buffer SB 1x.

Digestión: Finalmente, se procedió a la realización de la digestión enzimática utilizando las siguientes concentraciones: 7.5uL de H<sub>2</sub>O, 2 uL de Buffer 10 x, 1 U de la enzima de restricción Bsl I (New England Biolabs, Inc Beverly MA, USA) y 10 uL del producto de amplificación obtenido anteriormente. Las condiciones utilizadas fueron: Por 2 horas a 55°C se programó la incubación de la enzima y 20 minutos la inactivación de la misma.

Genotipificación: Homocigota silvestre (5G/5G). Homocigota mutado (4G/4G) y Heterocigota (4G/5G)

Una vez ya realizada la digestión enzimática. Los fragmentos obtenidos fueron separados y visualizados en un gel de agarosa al 2 % utilizando también el buffer SB 1x. Para medir el tamaño del fragmento se utilizó un marcador de peso molecular que va 100 pb a 1000 pb. Por lo tanto, los fragmentos fueron genotipificados dependiendo del tamaño de la banda. Fue de la siguiente manera:

- 77 pb- Homocigota silvestre (5G/5G)
- 99 pb- Homocigota mutada (4G/4G)
- 77 pb/ 99 pb- (Presencia de ambas bandas) Heterocigota

## **RECURSOS PARA EL ESTUDIO**

### **HUMANOS**

Se contará con la participación del personal de médicos adscritos, becarios y de enfermería del Hospital de la Mujer de Aguascalientes, personal de laboratorio de Ingeniería Genética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, designados por el responsable técnico de la institución proponente del protocolo de investigación, así como de los investigadores participantes, en el horario regular de trabajo.

### **MATERIALES**

Se cuenta con las instalaciones del Hospital de la Mujer de Aguascalientes para la atención de las pacientes incluidas en el protocolo de investigación y la obtención de muestras, y material perteneciente a la institución (hojas, bolígrafos, expedientes clínicos, computadora, impresora, tubos lila para recolección de muestras) así como como contamos de igual manera con las instalaciones, dispositivos, reactantes y materiales necesarios para el procesamiento de las pruebas moleculares en laboratorio de Ingeniería Genética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

### **FINANCIEROS**

Los recursos económicos de papelería y lo correspondiente a ello, así como tubos de recolección de muestra se obtienen del Hospital de la Mujer de Aguascalientes, lo correspondiente al procesamiento de la muestra en la cual se realizó extracción, amplificación, digestión y genotipificación de DNA, se realizó con reactivos otorgados por el laboratorio de Ingeniería Genética de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

## **CONSIDERACIONES BIOÉTICAS**

Este protocolo de investigación cumple y se adhiere con el reglamento federal de la Ley General de salud en materia de investigación para la salud, en la última reforma publicada el 02 de abril de 2014, en el diario oficial de la federación. En el artículo 17, se considera como riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio, por lo que se considera como una investigación de riesgo mínimo, que contempla exámenes físicos, psicológicos o de diagnóstico o tratamiento rutinario, investigación con medicamentos de uso común, que tengan amplio margen terapéutico, con indicaciones, dosis, y vías de administración establecidas y que no sean los medicamentos de investigación.

Esta investigación se adhiere a los lineamientos de la declaración de Helsinki, de la última asamblea general, en Fortaleza, Brasil en octubre de 2013, como se muestran en los siguientes apartados: El deber del médico es promover y velar por la salud, bienestar y derechos de los pacientes, incluidos los que participan en investigación médica. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de ese deber. El progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudios de seres humanos. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos). Incluso, las mejores intervenciones probadas deben ser evaluadas continuamente a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.

La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover y asegurar el respeto a todos los seres humanos y para proteger a su salud y sus derechos individuales, aunque el objetivo principal de la investigación médica es generar nuevos conocimientos, este objetivo nunca debe tener primacía sobre los derechos y los intereses de la persona que participa en la investigación.

**CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES**

Actividades	enero - junio 2017	julio - dic. 2017	enero - junio 2018	julio - dic 2018
1. Toma de muestras y recolección de datos	R	R	R	R
2. Aprobación de protocolo		R		
3. Búsqueda de Bibliografía			R	R
4. Análisis de datos y elaboración de tesis			R	R
5. Elaboración de resultados y conclusiones				R
6. Entrega de tesis				R

## RESULTADOS

El estudio incluyó una muestra de 80 pacientes del Hospital de la Mujer del estado de Aguascalientes distribuidas en 2 grupos, de las cuales 36 de ellas pertenecen en el grupo 1 y constituyen los casos y 44 pertenecen al grupo 2, las cuales son controles, en la tabla 1 se muestra la estadística descriptiva y evaluación de la independencia, obtenida de los datos de los grupos casos y controles, se observa una población heterogénea en la atención médica, con edad promedio de  $(25.18 \pm 9.42)$  en los controles y  $(26.86 \pm 12.18)$  en casos, lo cual no representa una diferencia estadísticamente significativa, otro aspecto importante es el número de gestación en ambos grupos ( $3.38 \pm 1.40$ ) para los casos y  $(2.27 \pm 1.55)$  para los controles, en esta variable si existe diferencia estadísticamente significativa ( $P=0.001$ ), es decir a mayor número de gestación, mayor riesgo de presentar aborto de repetición, por su parte el número de aborto es otra variable con diferencia significativa ( $P=0.001$ ) ya que para los casos presentan un promedio de  $(2.33 \pm 0.86)$ , en comparación con los controles  $(0.09 \pm 0.29)$ , esto refleja que al contar con antecedente de aborto, se suma mayor riesgo de repetirse en embarazo siguiente, de acuerdo a la edad gestacional promedio para los controles  $(31.61 \pm 5.54)$ , y para los problema  $(16.7 \pm 7.52)$ , aunque el rango de desviación estándar es muy amplio no tiene significancia estadística, por lo que se sugiere que se obtuvo adecuado control en la selección de pacientes para cada grupo, de acuerdo al número de partos ambos grupos presentaron semejanza, el 88.75% del total de las pacientes refieren haber ingerido medicamentos durante el embarazo, entre los más mencionados destaca, fumarato ferroso, ácido fólico, calcio, cefalexina, amoxicilina, nistatina óvulos, metronidazol óvulos y nifedipino, en su gran mayoría, en las variables correspondientes a antecedentes heredofamiliares y antecedentes personales, el grupo control presento menor incidencia de los mismos, en comparación del grupo casos, los cuales se presentaron con mayor proporción en ellos, pero estos datos sin diferencia estadísticamente significativa. (Tabla 1)

VARIABLE	CASOS N = 36	CONTROL N= 44	P (x <sup>2</sup> calculada)	(x <sup>2</sup> critica) 3.8415
EDAD	26.86 ± 12.18	25.18 ± 9.42	0.489	
<b>N. GESTA</b>	<b>3.38 ± 1.40</b>	<b>2.27 ± 1.55</b>	<b>0.001</b>	
N. PARTO	2.92 ± 2.28	2.56 ± 1.16	0.394	
<b>N. ABORTO</b>	<b>2.33 ± 0.86</b>	<b>0.09 ± 0.29</b>	<b>0.001</b>	
EDAD GESTACIONAL	16.7 ± 7.52	31.61 ± 5.54	0.407	
INGESTA MEDICAMENTO	31/36	40/44	0.14	
AHF TROMBOSIS	5/36	2/44	0.176	
AHF ENF. VENOSA	7/36	6/44	0.59	
AHF DM	14/36	10/44	0.187	
HISTORIA INFERTILIDAD	1/36	0/44	0.4698	
APP TROMBOSIS	1/36	0/44	0.469	
ENF. EDOCRINA	2/36	0/44	0.217	
ENF. AUTOINMUNE	0/36	1/44	1	

*Tabla 1. Estadísticas descriptivas y evaluación de independencia en relación a las variables y la información obtenida en el cuestionario.*

Para determinar la prevalencia de los genotipos y alelos que existen en la población de estudio, se tomaron los totales de cada genotipo, se sumaron los alelos de cada genotipo y se obtuvieron las proporciones, es importante señalar que la población de estudio fue de 80 mujeres y, por lo tanto, comprende 80 genotipos y 160 alelos.

De acuerdo a los resultados obtenidos del Factor V de Leiden, la frecuencia génica del genotipo homocigoto mutado (AA) fue de 0, no se obtuvieron genotipos mutados, del heterocigoto (GA) la frecuencia reportada es de 51.25%, y para el homocigoto silvestre (GG) la frecuencia es de 48.75%, (Tabla 2), respecto a las frecuencias alélicas, se encontró una frecuencia para el alelo mutado (A) 51.25%, y para el alelo silvestre (G) 99% (Tabla 3). Con los resultados de PAI- 1, la frecuencia génica del genotipo homocigoto mutado (4G/4G) fue de 13.75%, del heterocigoto (4G/5G) la frecuencia es de 57.5%, y para el homocigoto silvestre (5G/5G) la frecuencia reportada es de 28.75%, (Tabla 2), respecto a las frecuencias alélicas, se encontró una frecuencia para el alelo mutado (4G) 71.25%, y para el alelo silvestre (5G) 86.25% (Tabla 3).

Y por último los resultados de MTHFR, la frecuencia génica del genotipo homocigoto mutado (TT) fue de 20%, del heterocigoto (CT) la frecuencia es de 36.25%, y para el homocigoto silvestre (CC) la frecuencia reportada es de 43.75%, (Tabla 2), respecto a las frecuencias alélicas, se encontró una frecuencia para el alelo mutado (T) 80%, y para el alelo silvestre (C) 86.25% (Tabla 3).

GEN	GENOTIPO	CASOS	CONTROL	(x <sup>2</sup> calculada)
FVL	GG	20 (25)	19 (23.75)	9.5
	GA	16 (20)	25 (31.25)	
	AA	0 (0)	0 (0)	
PAI-1	5G/5G	7 (8.75)	16 (20)	2.49
	4G/5G	26 (32.5)	20(25)	
	4G/4G	3 (3.75)	8 (10)	
MTHFR	CC	18 (22.5)	17 (21.25)	4.29
	CT	11 (13.75)	18 (22.5)	
	TT	7 (8.75)	9 (11.25)	

Tabla 2. Frecuencias génicas observadas en la población.

GEN	ALELOS	CASOS	CONTROL
FVL	G	36 (45)	44 (54)
	A	16 (20)	25 (31.25)
PAI-1	5G	33 (41.25)	36 (45)
	4G	29 (36.25)	28(35)
MTHFR	C	29 (36.25)	35 (43.75)
	T	18 (22.5)	27 (33.75)

*Tabla 3. Frecuencias alélicas observadas en la población.*

Con las frecuencias alélicas, se obtuvieron las frecuencias esperadas de acuerdo al modelo de Hardy- Weinberg para ver si la población se encontraba en equilibrio, utilizando la ecuación ( $p^2+2pq + q^2 = 1$ ). A su vez se rechazó la prueba de chi cuadrada ( $x^2$ ) para ver si la población se encontraba o no en equilibrio, la interpretación fue de la siguiente manera. La Hipótesis nula ( $H_0$ ) manejaba, que la población estaba en equilibrio sino existía variación entre lo observado y el modelo esperado, y la Hipótesis alternativa ( $H_a$ ) que no había equilibrio si había diferencia entre el valor observado y el modelo esperado. Por lo tanto, la región de rechazo se alcanzada, cuando la  $x^2$  calculada  $>x^2$  crítica. Para obtener la  $x^2$  se utilizó la tabla chi cuadrada, con un nivel de significancia de 0.05 y un grado de libertad 1.

En la tabla 4, se observa de manera resumida las frecuencias observadas y las esperadas según el modelo de equilibrio de Hardy- Weinberg. Así como los datos obtenidos de la  $x^2$  que se utilizó para ver si la población se encontraba o no en equilibrio.

Como se había mencionado anteriormente, la región de rechazo se alcanzaba cuando  $x^2$  calculada era mayor a  $x^2$  crítica (0.005,1), Y se determinó que en el FVL que  $9.5 < 3.8415$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula, en PAI -1 se observó que  $2.49 > 3.8415$ , por lo que se acepta la hipótesis nula, y por último lo reportado en MTHFR es que  $4.29 < 3.8415$ , por lo que se al igual que FVL se rechaza la hipótesis nula, y por lo tanto, al ver que no existen diferencias entre lo observado y lo esperado se determinó que la población se encontraba en equilibrio.

GENOTIPO	FRECUENCIA OBSERVADA	FRECUENCIA ESPERADA		
GG	39	44.24	$\chi^2$ critica	3.8415
GA	41	30.49	$\chi^2$ calculada	9.5
AA	0	5.25	Df	1
5G/5G	23	26.45	$\chi^2$ critica	3.8415
4G/5G	46	39.1	$\chi^2$ calculada	<b>2.49</b>
4G/4G	11	14.45	Df	1
CC	35	30.63	$\chi^2$ critica	3.8415
CT	29	37.74	$\chi^2$ calculada	4.29
TT	16	11.63	Df	1

*Tabla 4. Comparación entre frecuencias observadas y esperadas, para determinar si la población se encuentra en equilibrio de acuerdo al modelo de Hardy- Weinberg.*

Se obtuvieron OR de cada una de las variables para verificar la correlación de riesgo con aborto de repetición. Solo se obtuvieron datos de las variables que se representan en la tabla 5.

La interpretación de los OR fue de la siguiente manera:

- OR > 1 = Asociación positiva y la probabilidad de alto riesgo.
- OR < 1 = Asociación negativa y baja probabilidad de riesgo
- OR = No hay asociación.

Sin embargo, las P- Valúe obtenidas tenían que ser menores que el intervalo de confianza el cual es 95%  $p = 0.005$ . Es por ello que se determinó con una P- Valúe de 0.001, que con cada gestación subsecuente la probabilidad de riesgo de presentar un aborto de repetición se eleva 1.73 veces, esto con IC de 95% (1.2219, 2.469), de igual manera como ya sabemos el simple hecho de estar embarazada eleva 2.5 veces el riesgo de presentar pérdida gestacional recurrente esto con una P- Valúe de 0.042 e IC de 95% (1.0228, 6.110).

Variable	OR	IC 95 %	P
EDAD	1.2262	(0.8628,1.742)	0.252
<b>N. GESTA</b>	<b>1.7369</b>	<b>(1.2219,2.469)</b>	<b>0.001</b>
N. PARTO	1.1206	(0.8757, 1.433)	0.362
<b>EMBARAZO ACTUAL</b>	<b>2.5</b>	<b>(1.0228, 6.110)</b>	<b>0.042</b>
INGESTA DE MEDICAMENTO	0.3875	(0.1068, 1.405)	0.138
AHF TROMBOSIS	3.0882	(0.5636, 16.92)	0.171
AHF ENF. VENOSA	1.3854	(0.4225, 4.542)	0.59
AHF DM	1.904	(0.7277, 4.981)	0.186

*Tabla 5. Verificación de la correlación (prueba de riesgo) de las variables con el aborto en repetición por medio del cálculo de OR, junto con sus intervalos de confianza y el P- Valué para cada caso. Se determinó que ninguna variable tenía correlación con el aborto.*

Modelo	Genotipo	OR	IC	P
Dominante	GG	—	—	—
	GA Y AA	0.608	(0.2503, 1.477)	0.27
Recesivo	GA Y AA	—	—	—
	GG	—	—	—
Aditivo	AA	—	—	—
	GA Y AA	—	—	—
	GG	—	—	—
Modelo	Genotipo	OR	IC	P
Dominante	5G/5G	—	—	—
	4G/4G Y 4G /5G	0.3205	(0.1252, 0.820)	0.015
Recesivo	4G/4G Y 4G /5G	—	—	—
	5G/5G	0.4091	(0.1000, 1.673)	0.194
Aditivo	4G/4G	0.3365	(0.1163, 0.973)	0.051
	4G/5G	0.2885	(0.0677, 1.228)	0.051
	5G/5G	—	—	—
Modelo	Genotipo	OR	IC	P
Dominante	CC	—	—	—
	CT Y TT	0.6296	(0.2581, 1.535)	0.308
Recesivo	CT Y TT	0.938	(0.3114, 2.830)	0.91
	CC	—	—	—
Aditivo	TT	0.5772	(0.2121, 1.570)	0.553
	CT Y TT	0.7346	(0.2236, 2.413)	0.553
	CC	—	—	—

Tabla 6. Modelos de herencia dominante, recesivo y aditivo, Homocigoto mutado (AA, TT, 4G/4G) heterocigoto (GA, CT, 4G/5G), homocigoto silvestre GG, CC, 5G/5Gy su posible relación con el aborto en repetición.

Se realizó el modelo genético para identificar los genotipos que presentan mayor susceptibilidad o correlación con el aborto de repetición, y determinar si las pacientes presentan combinación de mutación. Para ello se realizó cálculo de OR y se utilizaron para los posibles mecanismos de herencia (dominante, recesivo, aditivo). La clasificación se describe en la tabla 6, de acuerdo a cada modelo y cada genotipo. Para el FVL muestra en el modelo dominante que solo los heterocigotos (GA) y el homocigoto mutado (AA) pueden ser susceptibles a presentar aborto de repetición, para PAI- 1, en el modelo dominante se muestra, que los homocigotos mutados (4G/4G) y el heterocigoto (4G/5G), son susceptibles a presentar aborto de repetición, en el modelo recesivo, el homocigoto silvestre (5G/5G) no es susceptible, y en aditivo, se muestra que el genotipo homocigoto mutado (4G/4G) y el heterocigoto (4G/5G), pueden aportar o mostrar correlación con el aborto de repetición. Los resultados obtenidos para MTHFR en el modelo dominante se observa que los homocigotos mutados (TT) y el heterocigoto (CT), son susceptibles a presentar abortos de repetición, en el modelo recesivo el homocigoto silvestre (CC) no es susceptible a presentar aborto de repetición, y en el modelo aditivo se muestra que el genotipo homocigoto mutado (TT) y heterocigoto (CT), muestran mayor correlación con abortos de repetición. Sin embargo, en los 3 modelos de los 3 genotipos reportados en la tabla 6, no se presentó mayor significancia ya que las P obtenidas son mayor al intervalo de confianza de 95%  $p= 0.005$ . Por lo tanto, ninguno presentó relación alta numéricamente. De acuerdo a los resultados obtenidos tanto para casos y controles solo una paciente de cada grupo presentó una combinación de mutación de MTHR y PAI-1 (4G/4G) y (TT).

## DISCUSIÓN

Puesto que el diagnóstico y tratamiento de la pérdida recurrente del embarazo sigue siendo un reto para el médico, es urgente unificar criterios operacionales, diagnósticos y terapéuticos. Cuando una pareja experimenta una pérdida gestacional se enfrenta a una importante carga emocional que los médicos debemos comprender. Existen diversos consensos y recomendaciones con propuestas sistematizadas para establecer el diagnóstico, con base a la información de las estadísticas etiológicas, para proporcionar al clínico una guía de tratamiento individualizado.

Por lo anterior se realizó este protocolo de investigación en conjunto con la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de las mutaciones del Factor V de Leiden, del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) e inhibidor del activador del plasminógeno (PAI- 1), de la coagulación en mujeres con pérdida gestacional recurrente, y comparar esta prevalencia con la literatura publicada. La población estudiada fue de 80 pacientes, de las cuales problema representan 34 pacientes y controles 44. En la revista publicada por la sociedad Argentina de hematología por la doctora Martha Zerga, se describen las trombofilias hereditarias como comunes en la población caucásica con una prevalencia de hasta el 15%, la frecuencia en la población de polimorfismo de PAI-1 es de 50% para heterocigoto (4G/5G) y 25 % para (4G/4G), homocigoto mutado, parecida a la reportada en nuestro estudio, ya que obtuvimos una frecuencia de (4G/5G) de 46% y de (4G/4G) 11%, la frecuencia reportada para MTHFR es de 40% en la población heterocigótica (CT) y 10% en la homocigótica mutada (TT), esta información reportada difiere un poco de la de nuestro estudio, encontrando una frecuencia de 29% en los heterocigotos y 16 % en los homocigotos. De igual manera la frecuencia reportada en un artículo publicado en El Sevier en 2017 realizado de una cohorte de Argentina, y la frecuencia obtenida en este protocolo para mutación del FVL es similar, es decir baja frecuencia (4%) pero alta relación con pérdida gestacional recurrente, en este estudio no se obtuvo ningún homocigoto mutado, es decir frecuencia de 0 (AA). Por lo que el consenso de FASGO, las guías de SAH, así como el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

consenso latinoamericano de Medicina Reproductiva publicado en 2015, refuerzan el tema de no estudiar estos polimorfismos en pacientes con abortos de repetición, ya que su relación con los mismo es baja, a excepción de mutación de FVL, dicho punto también difiere de nuestro estudio, ya que nosotros encontramos relación de pérdida gestacional recurrente con las tres trombofilias estudiadas, por lo que nosotros si recomendamos incluir su estudio en pacientes con pérdida gestacional recurrente. Los extensos estudios recientes prospectivos de cohorte realizados en Europa encontraron de igual manera un muy bajo índice de asociación para las trombofilias hereditarias en relación con estudios más antiguos o estudios casos control con bajo número de pacientes. Puede decirse que su asociación con complicaciones gestacionales es controvertida. Rodger y col. En un metaanálisis reciente concluye que las mujeres que son portadoras de FVL o PTG20210A no presentan un incremento de riesgo de desprendimiento prematuro de placenta normoinserata o riesgo de recién nacido con peso bajo para la edad gestacional; solo observó un incremento absoluto de riesgo de pérdida de embarazo en portadores de FVL, coincidiendo con este estudio, ya que se realizó un modelo genético para identificar los genotipos que presentar mayor susceptibilidad o correlación con aborto de repetición, calculando OR, para el FVL se muestra en el modelo dominante que solo los heterocigotos (GA) y el homocigoto mutado (AA), pueden ser susceptibles a presentar aborto de repetición, como ya se mencionó en nuestro estudio no se reportaron homocigoto mutado (AA), la frecuencia obtenida para el heterocigoto (GA) es de 51.25%.

Centrándonos en las variables de nuestro estudio; la correspondiente a pérdida gestacional recurrente e historia personal o familiar de trombosis, observamos que 13% de las muestra problema presentan antecedentes familiares de trombosis y 4.54% de controles la presenta, así como antecedentes personales de trombosis, 2.7% de casos contra 0% de controles, estos resultados se relacionan a los publicados en el estudio EPCOT (European Prospective Cohort on Thrombophilia), en el cual se evaluó el riesgo de muerte fetal en mujeres con trombosis familiar sin antecedentes previo de muerte fetal y concluyeron que si bien el riesgo estaba levemente aumentado, la posibilidad de una buena evolución era similar en ambos grupos con o sin trombosis hereditaria. La guía de práctica clínica reporta una fuerte relación entre edad materna avanzada y pérdida gestacional recurrente, esta se asocia con mayor pérdida de la misma, quizás porque refleja la mala calidad de los ovocitos, en mujeres menor de 35 años

de edad, el riesgo de pérdida gestacional es de 9-12%, mientras que en mayores de 40 años alcanza incluso el 50%, de igual manera esto se evidencia en nuestro estudio ya que nuestra pacientes problema presentan una edad promedio de 26.86 años  $\pm$  12.18, abarcando gran rubro de edad, en cambio las control presentaron edad promedio de 25.18  $\pm$  9.42 años, de igual manera la multiparidad se relaciona con pérdida gestacional recurrente, con resultados similares en nuestro estudio, así como el diagnóstico de alguna endocrinopatía en específico diabetes mellitus está relacionado a pérdida gestacional recurrente, los resultados de nuestro estudio son similares a los publicados, ya que 5.5% de nuestra población problema presentó diagnóstico de diabetes mellitus en comparación con 0% de las pacientes controles, en la literatura se reporta que entre y 8 y 15% de los casos de pérdida gestacional recurrente del embarazo se relacionan con endocrinopatías, principalmente: disfunción tiroidea, hiperprolactinemia, diabetes mellitus, síndrome de ovario poliquístico y defecto del cuerpo lúteo; la diabetes mellitus mal controlada eleva el riesgo de aborto como malformaciones fetales, y aumenta la probabilidad de muerte fetal intrauterina, sobre todo en pacientes con hemoglobina glucosilada elevada en el primer trimestre. La probabilidad de aborto en una paciente con diabetes controlada es de 15%, y aumenta a 45% en quienes tienen inadecuado control metabólico.

El pasado reproductivo es otra variable descrita en este estudio, y debe ser tomado en consideración al momento de estudiar y tratar a una pareja que consulta por aborto recurrente. Un gran estudio prospectivo realizado en Europa con mujeres fértiles mostró una tasa global de aborto clínico espontaneo de 12%, sin embargo, dicha tasa fue de 24% en mujeres que solo habían experimentado abortos y tan baja como 4% o 5% en primigesta o multíparas respectivamente. A medida que aumenta el número de abortos previos, mayor es la probabilidad de presentar un nuevo aborto, no obstante, el haber tenido uno o más hijos vivos disminuye este riesgo en pacientes con 2 o más abortos, datos parecidos a los reportados en este estudio, ya que las pacientes problema presentaron 2.33 abortos en comparación con 0.09 con los controles.

Las guías de práctica clínica y varias actualizaciones están en proceso, así como múltiples estudios prospectivos de caos y controles, y metaanálisis. Trabajos como este pueden apoyar

a fundamentar las bases del proceso de homologación de criterios y establecer una guía de diagnóstico y tratamiento en nuestro hospital.

La demanda actual de la mujer por encontrar una respuesta a las pérdidas recurrentes del embarazo y otras complicaciones gestacionales ha hecho incrementar en los últimos años la solicitud de estudios de trombofilia. Este grupo de pacientes es vulnerable y acepta todo tipo de estudio o tratamiento para llevar a término su embarazo. La información adecuada es importante para la toma de decisiones.



## CONCLUSIÓN

- Se acepta la hipótesis alterna y se rechaza la hipótesis nula, ya que en este protocolo de estudio; si existe relación entre mutaciones del factor V de Leiden G1691A, Metilentetrahidrofolato reductasa MTHFR (polimorfismos CT y TT) e Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI 1), y pérdida gestacional recurrente.

- La prevalencia de aborto de repetición está relacionada en las pacientes multigestas, ya que la probabilidad de riesgo de presentar aborto de repetición se eleva 1.73 veces en cada embarazo.

- El embarazo per se representa un riesgo de 2.5 veces de presentar aborto de repetición.

- El antecedente de aborto representó una variable con diferencia estadísticamente significativa al comparar casos y controles.

- El resto de las variables no demostró diferencia estadísticamente significativa en este protocolo.

-No se presenta combinación de mutaciones en las pacientes con pérdida gestacional recurrente.

- En base a lo que encontramos, y de acuerdo a la población de estudiada, se recomienda incluir en el protocolo de estudio de pérdida gestacional recurrente a las trombofilias estudiadas en esta investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. D Uva M, M. P. (2010). Recurrent pregnancy loss and thrombophilia. *Clin Med Res*, 18-22.
2. Jose Daniel Flores Alatraste, S. J. (2014). Pacientes con trombofilias hereditarias y pérdida gestacional recurrente: incidencia. *Revista Mexicana de Ginecología y Obstetricia*, 383-388.
3. Baek KH, L. E. (2007). Recurrent Pregnancy loss: the key potential mechanisms. *Trends Mol Med* , 310-317.
4. Bogdanova N, M. A. (2010). Hereditary thrombophilic risk factors for recurrent pregnancy loss. *J. Community Genet* , 47-53.
5. Alfirevic Z, R. D. (2002). How strong is the asociation between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* , 6-14.
6. Lykke JA, B. L. (2012). Thrombophilias and adverse pregnancy outcomes: results from the Danish National Birth Cohort. *J. Thromb Haemost*, 1320-1325.
7. Serguei A. Castañeda, W. D. (2002). Trombofilias heredadas y perdida gestacional recurrente. *IATREIA*, 170-178.
8. Frosst P, H. B. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in MTHFR. *Nat Genet*, 111-113.
9. KG., M. (1999). Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Hemost* , 165-174.
10. Bertina RM, K. B. (14-15). Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994.
11. Torres JD. (1997). Resistencia a la proteina C activada: Una nueva causa de trombofilia. *IATREIA*, 114-119.

12. Paramo JA, R. E. (1992). Fibrinolysis y trombosis venosa. *Sangre*, 88-94.
13. Colucci M, P. J. (1986). Inhibition of one-chain and two-chain forms of human tissue-type plasminogen activator by the fastacting inhibitor of plasminogen activator in vitro and in vivo. *J Lab Clin Med*, 53-59.
14. Fay W.P, S. A. (1992). Complete deficiency of plasminogen- activator inhibitor type 1 due to a frame shift mutation. *N. Engl J Med*, 1729-1733.
15. Nordt TK, L. J. (2001). Regulation of PAI 1, expression by genetic polymorphisms impact on atherogenesis. *Thomb Rest*, 51-55.
16. Kang SS, P. W. (1996). Genetic and nongenetic factors for moderate hyperhomocysteinemia. . *Atherosclesosi*, 135-138.
17. BagleyP. J, S. J. (1998). Common mutation in the MTHFR gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 13217-13220.
18. Van der Put NM, F. G. (1998). A second common mutation in the MTHFR gene: and additional risk factor for neural tube defects. *A.m. J. Hum Genet*, 1044-1051.
19. Skibola CF, S. M. (1999). Polymorphisms in the MTHFR gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA*, 12810-12815.
20. Wiemels JL, S. R. (2001). Polymorphisms in the MTHFR polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia . *Proc Natl Acad Sci USA*, 4004-4009.
21. Krajcinovic M, L. S. (2004). Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 252-257.
22. Nilsson IM, A. B. (1975). Intrauterine death and circulating anticoagulant, antithomboplastin. *Acta med Scand*, 153-159.

23. De Wolf F, Carreras LO, R. M. (1982). Decidual vasculopathy and extensive infarction in a patient with repeated thromboembolic accidents. recurrent fetal loss and lupus anticoagulant. *Ostet Gynecol*, 829-824.
24. Sebire N, B. M. (2003). Placental pathology, antiphospholipid antibodies and pregnancy outcome in recurrent miscarriage patients. *Obstec Gynecol*, 258-263.
25. Miyakis S, L. M. (2006). International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *APS*, 295-306.
26. Rosove M, T. B. (1990). Heparin therapy for pregnant women with lupus anticoagulant or anticardiolipin antibodies. *Obstet Gynecol*, 630-634.
27. Kupferminc M, Eldor A, S. N. (1999). Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N. Eng J. Med*, 1-11.
28. Preston FE, Rosendal FR, W. I. (1996). Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet*, 913-916.
29. Vossen Cy, P. F. (2004). Hereditary thrombophilia and fetal loss a prospective follow up study. *Throm Haemost*, 592-596.
30. Sasson B-J, Lenseing A, P. M. (1999). Safety of Low- Molecular Weight Heparin in pregnancy a sistematic review. *Throm Haemost*, 668-672.
31. Dahlback B, C. M. (1993). Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1004-1008.
32. Varela A, B. M. (2000). Prevalencia de la mutacion del factor V de Leiden en donantes de banco de sangre en cuatro ciudades colombianas. *Acta Med Col*, 2-5.
33. Hiyoshi M, H. S. (1999). A Thai patient with the mutation of Arg 306 of V gene identical to the Hong Kong but not to the Cambridge type. *Thomb Haemost*, 1553-1554.

34. B., W. G. (2006). Material issues in thrombosis and thrombophilia. *Perinatal medicine* , 2044-2050.
35. Brenner B, A. A. (2005). Hemostasis in normal pregnancy . *Thromb Tes.*, 6-10.
36. FRANCO RF, E. J. (1999). The prevalence of factor V Arg 306- Thr (Factor V Cambridge) And factor V 306, Gly mutations in different human population . *Thomb Haemost*, 312-313.
37. Gynecologist, A. C. (2013). Task Force on Hypertension in pregnancy. Report of Amerian College of Obstetricians and Gynecologist . *Obstet Gynecol*, 1122-1231.
38. ACOG. (2002). Prcatice Bulletin No 102. Management of stillbirth *Obstet Gynecol*, 748-761.
39. Loskutoff DJ, S. M. (1989). Type 1 plasminogen activator inhibitor. *Haemost Thomb*, 87-115.
40. Mc Namee K, D. F. (2012). Recurrent miscarriage and thrombophilia: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol* , 229-234.
41. NJ., W. R. (2015). Is thrombophilia asociated with placenta mediated pregnancy complications . A prospective cohort study. *Throm Haemost*.
42. P., I. V. (2007). Estudios de trombofilias, analisis molecular de algunos factores relacionados con la atletracion de la hemostasia. *Revista Medica Clinica Condes*, 394-398.
43. RM., B. (2001). Genetic approach to thombophilia. *Thrombo Haemost*, 92-103.
44. Silvia Perez Wingeyer, F. A. (2017). Trombofilia hereditaria y pérdidas de embarazo.

**ANEXOS**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**



HOSPITAL DE LA MUJER, ISSEA      FECHA \_\_\_\_\_

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN PROYECTOS DE INVESTIGACION CLINICA.**

Por medio de la presente declaro mi deseo de participar en el proyecto de investigación titulado: “Prevalencia de las mutaciones del factor V Leiden, de la Protrombina G20210A y MTHFR, de la coagulación en mujeres con pérdidas fetales recurrentes y abortos, atendidos en el Hospital de la Mujer del ISSEA de enero de 2017 a diciembre de 2018”

Con rregistró ante el Comité Estatal de Investigación en Salud del ISSEA con el número: \_\_\_\_\_

El objetivo de este estudio es: Determinar la prevalencia de mutaciones del factor V Leiden G1691A, de la Protrombina G20210A y MTHFR (polimorfismos CT y TT) así como PAI-1 (polimorfismo 4G/5G)

Se me ha explicado que mi participación consistirá en toma de una muestra de sangre de vena periférica, declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de este procedimiento El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna acerca del resultado, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le planteé acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos que son los derivados de una toma de muestra hemática de una vena periférica me fueron explicados, así como los beneficios que consisten en conocer si poseo alguna alteración genética estudiadas en la presente investigación . Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo del Hospital de la Mujer.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con su privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del investigador principal

Testigo 1

Testigo 2

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS



Nombre\_\_\_\_\_ Expediente\_\_\_\_\_ Fecha\_\_\_\_\_

Edad\_\_\_\_\_ No. de gesta\_\_\_\_\_ No. de Parto\_\_\_\_\_ No. De aborto\_\_\_\_\_

No. De muerte fetal\_\_\_\_\_ Edad gestacional\_\_\_\_\_

Ingesta de medicamento durante el embarazo\_\_\_\_\_

AHF de Trombosis\_\_\_\_\_

AHF Enfermedad venosa\_\_\_\_\_

AHF diabetes\_\_\_\_\_

Historia de Infertilidad\_\_\_\_\_

Historia de Enfermedad autoinmune\_\_\_\_\_

Historia previa de trombosis\_\_\_\_\_

Historia de enfermedad endocrina\_\_\_\_\_

Anticuerpos Anticardiolipina\_\_\_\_\_

Mutación G20210A de la protombina\_\_\_\_\_

Factor V Leyden\_\_\_\_\_

Polimorfismo MTHFR\_\_\_\_\_

RECABO LA INFORMACION\_\_\_\_\_

CLASIFICO LA MUESTRA\_\_\_\_\_