

**ANÁLISIS MUTACIONAL DEL FACTOR V DE LEIDEN, PROTROMBINA  
G20210A Y METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA C677T Y A1298C  
EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON SUSCEPTIBILIDAD A TROMBOFILIA**

**SILVIA MARGARITA GARCÍA ACUÑA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANATÓMICA Y CLÍNICA  
BOGOTÁ  
2011**

**ANÁLISIS MUTACIONAL DEL FACTOR V DE LEIDEN, PROTROMBINA  
G20210A Y METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA C677T Y A1298C  
EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON SUSCEPTIBILIDAD A TROMBOFILIA**

**SILVIA MARGARITA GARCÍA ACUÑA**

**CÓDIGO 05 - 597837**

**Trabajo de Grado para optar al título de  
Especialista en Patología Anatómica y Clínica**

**Director**

**Dr. Juan José Yunis Londoño**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANATÓMICA Y CLÍNICA  
BOGOTÁ  
2011**

## DEDICATORIA

*Este proyecto de vida, la definición de un futuro, la culminación de un sueño, el principio y el fin de una etapa maravillosa, está dedicado con todo mi amor a mis padres y a mis hermanas, porque de ellos he aprendido la responsabilidad, la entrega y el amor al trabajo, necesarios para ser exitoso no sólo a nivel profesional sino también personal.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A todas las personas que conocí durante este trayecto, mil y mil gracias por haberme permitido crecer en todos los sentidos.

Especial reconocimiento a mi director de proyecto, Dr. Juan José Yunis por haberme mostrado un mundo totalmente desconocido para mí y hacerme ver que podía ser parte de él.

A la Dra. Helena Hernández Cuervo, investigadora, por su invaluable ayuda en el campo experimental y analítico.

Al Dr. Andrés Leonardo González, por hacerme entender que los números no son necesariamente enemigos.

A Paola Andrea García Acuña, por regalarme su talento en las gráficas de este trabajo.

A mi familia, a mis amigos, a mis compañeros, muchas gracias por la paciencia durante estos cuatro años.

A Javier por haberme cambiado la vida en menos de cuatro meses.

Finalmente, a los profesores del Departamento de Patología de la Universidad Nacional de Colombia, el mayor de los agradecimientos por haber creído en mí, y haberme permitido experimentar la mejor de las residencias, de una manera íntegra, respetuosa, haciéndome sentir siempre en casa.

## RESUMEN

### **ANÁLISIS MUTACIONAL DEL FACTOR V DE LEIDEN, PROTROMBINA G20210A Y METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA C677T Y A1298C EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON SUSCEPTIBILIDAD A TROMBOFILIA**

**Autor:** Dra. Silvia Margarita García Acuña

**Director:** Dr. Juan José Yunis Londoño

**Trabajo de Grado:** Especialidad en Patología Anatómica y Clínica

**Facultad de Medicina**

**Universidad Nacional de Colombia**

**Enero de 2011**

## RESUMEN

La trombosis es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo aumentando de 1 por 100000 personas durante la infancia a 1 por 100 personas en los adultos mayores con una evidencia que demuestra la alta prevalencia de genes mutados que aumentan la susceptibilidad. Entre ellos se encuentran el Factor V de Leiden, la mutación de la protrombina G20210A y los polimorfismos C677T y A1298C de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa.

Se tomaron 128 pacientes con historia de un evento tromboembólico o pérdida gestacional recurrente sin otros factores de riesgo y como controles 200 individuos caucasoides.

Se encontró heterocigocidad para el Factor V de Leiden en el 17% de los pacientes y en el 1.5% de los controles con un OR de 15.94 (IC 95%; 4.70-54.04); no se identificaron sujetos homocigotos. La mutación en Protrombina y MTHFR C677T no evidenciaron asociación con la presencia de enfermedad. El análisis estratificado de MTHFR A1298C detectó una asociación con las mujeres que presentaban pérdida gestacional recurrente (OR 4.06 IC95% 1.47-11.23). También se demostró una clara tendencia hacia una interacción entre la mutación del Factor V y este polimorfismo al observarse un aumento del OR a 21.6 (IC95%; 2.8-946.2) en pacientes con las dos alteraciones.

Dadas las asociaciones demostradas, se requieren estudios prospectivos que analicen tratamientos preventivos con anticoagulación en pacientes con las mutaciones y evaluar la aparición de nuevos eventos, y mejor aún evitar el desarrollo de los mismos en pacientes con las alteraciones sin historia clínica de la enfermedad.

**Palabras claves:** trombosis, Factor V de Leiden, protrombina G20210A, metilentetrahidrofolato reductasa

**MUTATIONAL ANALYSIS OF FACTOR V LEIDEN, PROTHROMBIN G20210A AND METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE C677T AND A1298C IN A SAMPLE OF PATIENTS SUSCEPTIBLE TO THROMBOPHILIA**

**ABSTRACT**

Thrombosis is a major cause of mortality and morbidity in the world rising from 1 per 100000 people during childhood to 1 per 100 people in older adults with evidence demonstrating the high prevalence of mutated genes that increase susceptibility. These include the Factor V Leiden, prothrombin mutation G20210A and C677T and A1298C polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase enzyme.

We took 128 patients with a history of thromboembolic events or recurrent pregnancy loss without other risk factors and 200 Caucasian individuals as controls.

We found heterozygosity for Factor V Leiden in 17% of patients and in 1.5% of controls with an OR of 15.94 (95% CI 4.70-54.04), no homozygous subjects were identified. The prothrombin mutation and MTHFR C677T showed no association with the presence of disease. Stratified analysis of MTHFR A1298C detected an association with women who had recurrent pregnancy loss (OR 4.06 95% CI 1.47-11.23). Also showed a clear trend towards an interaction between the Factor V mutation and the polymorphism with an increase in OR to 21.6 (95% CI, 2.8-946.2) in patients with both disorders. Given the demonstrated associations, prospective studies are needed to analyze preventive treatment with anticoagulants in patients with mutations and evaluate the occurrence of new events, and better yet, prevent the development of these abnormalities in patients with no history of disease.

**Keywords:** thrombosis, Factor V Leiden, prothrombin G20210A, methylenetetrahydrofolate reductase

## CONTENIDO

RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. JUSTIFICACIÓN.....	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	12
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
4. MARCO TEÓRICO .....	13
4.1 GENERALIDADES .....	13
4.2 HEMOSTASIS Y REGULACIÓN DE LA COAGULACIÓN .....	13
4.3 FACTORES DE RIESGO.....	17
4.3.1. Factores de Riesgo adquiridos: .....	17
4.3.2 Factores de riesgo hereditarios .....	19
4.4 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS TROMBOFILIAS.....	19
4.4.1 Factor V de Leiden.....	20
4.4.2 Mutaciones en la Protrombina .....	22
4.4.3 Polimorfismos en la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) .....	23
4.5 TROMBOFILIA E IMPACTO EN EL EMBARAZO .....	25
4.6 PRUEBAS GENÉTICAS PARA DETECCIÓN DE ALTERACIONES EN FACTORES DE COAGULACIÓN .....	26
5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	30
5.1 DISEÑO.....	30
5.2 POBLACIÓN A ESTUDIO .....	30

5.3 MÉTODOS .....	30
5.4 ANÁLISIS DE DATOS .....	32
6. RESULTADOS.....	36
7. DISCUSIÓN .....	39
8. CONCLUSIONES .....	43
9. BIBLIOGRAFÍA.....	44



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la cascada de coagulación.....	14
Figura 2. Vía de la Proteína C.....	15
Figura 3. Mecanismos inhibidores de la antitrombina .....	16
Figura 4. Mecanismo de resistencia a la proteína C activada secundario a la mutación del Factor V (Factor V de Leiden). .....	21
Figura 5. Metabolismo de la homocisteína .....	23
Figura 6. Productos de amplificación Factor II y V.....	33
Figura 7. Producto de amplificación para MTHFR C677T .....	33
Figura 8. Producto de amplificación para MTHFR A1298C .....	33
Figura 9. Productos de restricción Factor II y V .....	34
Figura 10. Productos de restricción MTHFR C677T .....	35
Figura 11. Productos de restricción MTHFR A1298C .....	35

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Métodos disponibles para la detección de Factor V de Leiden y Factor II G20210A.....	28
Tabla 2. Primers usados para la amplificación del DNA y tamaño de los amplicones en la PCR y en la restricción.....	32
Tabla 3. Frecuencias alélicas en Factor V de Leiden, Factor II (protrombina G20210), MTHFR C677T y A1298.....	37

## 1. INTRODUCCIÓN

La trombosis es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo aumentando de 1 por 100000 personas durante la infancia a 1 por 100 personas en los adultos mayores con una evidencia que demuestra la alta prevalencia de genes mutados que aumentan la susceptibilidad (1).

El imbalance entre los sistemas procoagulantes y sus mecanismos regulatorios causado por la interacción entre factores genéticos y adquiridos, es un paradigma multifactorial en el cual éstos interactúan de manera cooperativa y llevan a un riesgo significativo para el desarrollo de trombosis (2).

De ahí que el reconocimiento de factores de riesgo ya establecidos y conocidos como las trombofilias heredadas, deben determinarse para establecer el potencial patológico en cada individuo, ya que de esto depende su tratamiento, seguimiento, prevención y estudios familiares.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El tromboembolismo venoso es el tercer desorden cardiovascular más prevalente después de la enfermedad isquémica y del choque, pudiendo desencadenar un embolismo pulmonar, evento que amenaza la vida. Más aún, los eventos trombóticos agudos generan un aumento en la morbilidad de los pacientes cuando éstos presentan síndromes posttrombóticos ó enfermedad recurrente (3).

En Estados unidos se ha estimado que aproximadamente dos millones de habitantes presentan algún episodio de tromboembolismo venoso al año, y 600.000 de ellos hacen embolismo pulmonar (4); a pesar de esta enorme cantidad de población afectada por la entidad, se sabe poco sobre su real patogénesis dado el carácter multifactorial que la caracteriza. Sin embargo, en los últimos 20 años se ha visto un incremento en el estudio de los factores hereditarios, también llamados trombofilias, detección que facilitaría a los clínicos decidir sobre la instauración de terapias de anti coagulación, duración del tratamiento y estudios de extensión a otros miembros de la familia (1).

Particularmente llaman la atención el estudio del Factor V de Leiden y Protrombina G20210A por ser las más frecuentes y en quienes se ha detectado mayor riesgo. En los últimos años, la hiperhomocisteinemia también se ha tenido en cuenta como factor de riesgo no sólo para trombosis venosa sino para otras alteraciones como defectos del tubo neural. En particular se estudian los polimorfismos de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa C677T y A1298C, los cuales han mostrado un leve incremento del riesgo (1).

En Colombia las patologías tromboembólicas contribuyen de manera importante a la morbimortalidad, presentándose entre 40.000 y 72.000 casos por año; este es el primer estudio en el país y en Suramérica que investiga la frecuencia de las mutaciones y polimorfismos antes descritos en la población general, haciendo énfasis en su asociación con la presencia de la enfermedad y aumento del riesgo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de la mutación G1691A en el gen para el factor V (Factor V de Leiden), la mutación G20210A del gen del Factor II y los polimorfismos C677T y A1298C de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa y establecer su relación con la presencia de trombofilias.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la frecuencia del FV Leiden en pacientes con trombofilia y compararla con la hallada en la población general
- Determinar la frecuencia de la mutación del FII G20210A en pacientes con trombofilia y compararla con la hallada en la población general
- Determinar la frecuencia de los polimorfismos de MTHFR A1298C y C677T en pacientes con trombofilia y compararla con la hallada en la población general
- Determinar si existe asociación entre las pérdidas gestacionales recurrentes y la presencia de las mutaciones y polimorfismos.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 GENERALIDADES

La definición clínica de trombosis es la presencia patológica de un tapón hemostático en un vaso sanguíneo o en el corazón que causa obstrucción del flujo sanguíneo a través del Sistema Circulatorio. Dependiendo de su localización la enfermedad trombótica puede ser venosa o arterial, siendo sus factores de riesgos y fisiopatología diferentes para cada una (5).

Además, es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad, generando una incidencia de 100 a 192 casos por 100000 personas-año; de éstos, un tercio presentan un émbolo pulmonar sintomático y los demás permanecen con una trombosis venosa profunda (6,7).

En 1884, Virchow postuló la teoría de una triada de anormalidades (lesión endotelial, estasis e hipercoagulabilidad) para explicar la etiología de la trombosis. Este concepto resultó profético, dado que ahora se ha demostrado que los tres componentes de la triada juegan un rol activo en el desarrollo de los fenómenos trombóticos. En los últimos años ha sido evidente que el riesgo de desarrollar la enfermedad es un proceso dinámico que resulta del sinergismo entre factores de riesgo adquiridos y trombofilias heredadas. Para poder entender cómo estos factores alteran el mecanismo de la formación del trombo, es necesario entender la fisiología normal de la hemostasis, los mecanismos que la regulan y los agentes de diversas índoles que aumentan el riesgo (8).

### 4.2 HEMOSTASIS Y REGULACIÓN DE LA COAGULACIÓN

La hemostasis es un mecanismo fisiológico que controla la fluidez de la sangre y tiene el potencial de inducir rápidamente la formación de un tapón en los sitios de daño con el objetivo de parar o disminuir el sangrado. Este proceso se realiza en tres diferentes fases. La primera de ellas, inicia con la adhesión de las plaquetas a las fibras de colágeno subyacentes al endotelio vascular, que han sido expuestas como consecuencia del daño. Esta adhesión es mediada por las glicoproteínas Ia/IIa y el factor de Von Willebrand (FvW) y como resultado las plaquetas empiezan a liberar diferentes factores de coagulación y de activación de

leucocitos. Posteriormente se adhieren una a otra a través de integrinas lo cual termina formando el tapón hemostático plaquetario proceso también denominado hemostasis primaria (4, 5, 9).

El proceso de coagulación como tal, también llamado hemostasis secundaria inicia con la exposición del factor tisular a la sangre, a partir de las capas subendoteliales y con gran afinidad y especificidad por las formas cimógena y activa del factor VII. Una vez unido al factor tisular activa a los factores IX y X. El IX a su vez interactúa con su cofactor no enzimático, el Factor VIIIa en la superficie de la plaqueta para formar el complejo “tenase”, el cual activa eficientemente al factor X. Éste, se ensambla en la membrana plaquetaria con el Factor Va y forma el complejo de la protrombinasa el cual es el encargado de transformar la protrombina a trombina y ella a su vez, convierte el fibrinógeno soluble a fibras de fibrina insolubles que se agregan al coágulo de fibrina suave (4, 5, 9)

La última parte de la hemostasis involucra la fibrinólisis. Su rol, es remover los depósitos de fibrina después de que el vaso lesionado ha sido restaurado, a través de la plasmina (forma activa del plasminógeno) de tal manera que la red de fibrina es disuelta (Figura 1) (4, 5, 9).

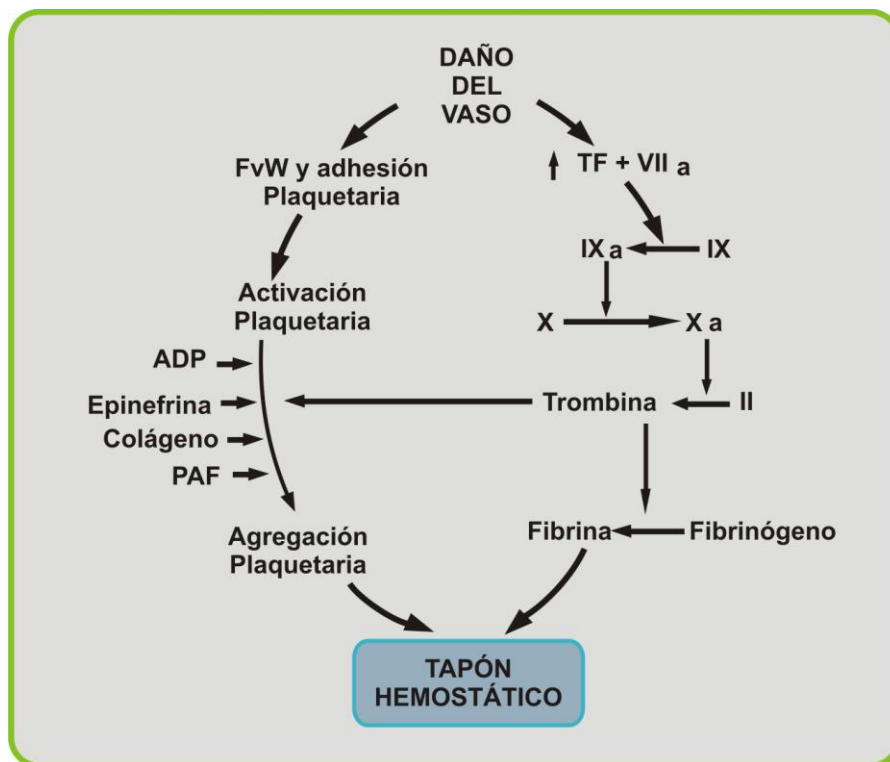


Figura 1. Esquema de la cascada de coagulación

Adaptado de McPherson & Pincus: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 21st ed.

La formación del coágulo es bastante rápida, sin embargo el peligro radica en que el exceso del proceso termine produciendo una trombosis. Es así, que la naturaleza ha creado varios mecanismos anticoagulantes para controlar las vías en diferentes niveles, dentro de los cuales se destaca el sistema de los inhibidores de proteasas séricas plasmáticas (antitrombina, alfa 2 macroglobulina y antitripsina) y la vía de la proteína C. Éste último es considerado el mayor sistema anticoagulante en vivo. Inicia con la presencia de un exceso de trombina no unida al coágulo que rápidamente se une a una glicoproteína transmembranal del epitelio llamada trombomodulina. Una vez unida, su capacidad pro coagulante es transformada a propiedades anticoagulantes al ser la encargada de activar a la Proteína C. Es así, que la Proteína C activada (APC) se une a un cofactor, la Proteína S en la superficie fosfolipídica de las plaquetas y rápidamente inactiva al factor Va y al VIIIa, y de esta manera disminuyen la generación de trombina en la vía pro coagulante (figura 2) (2,5).

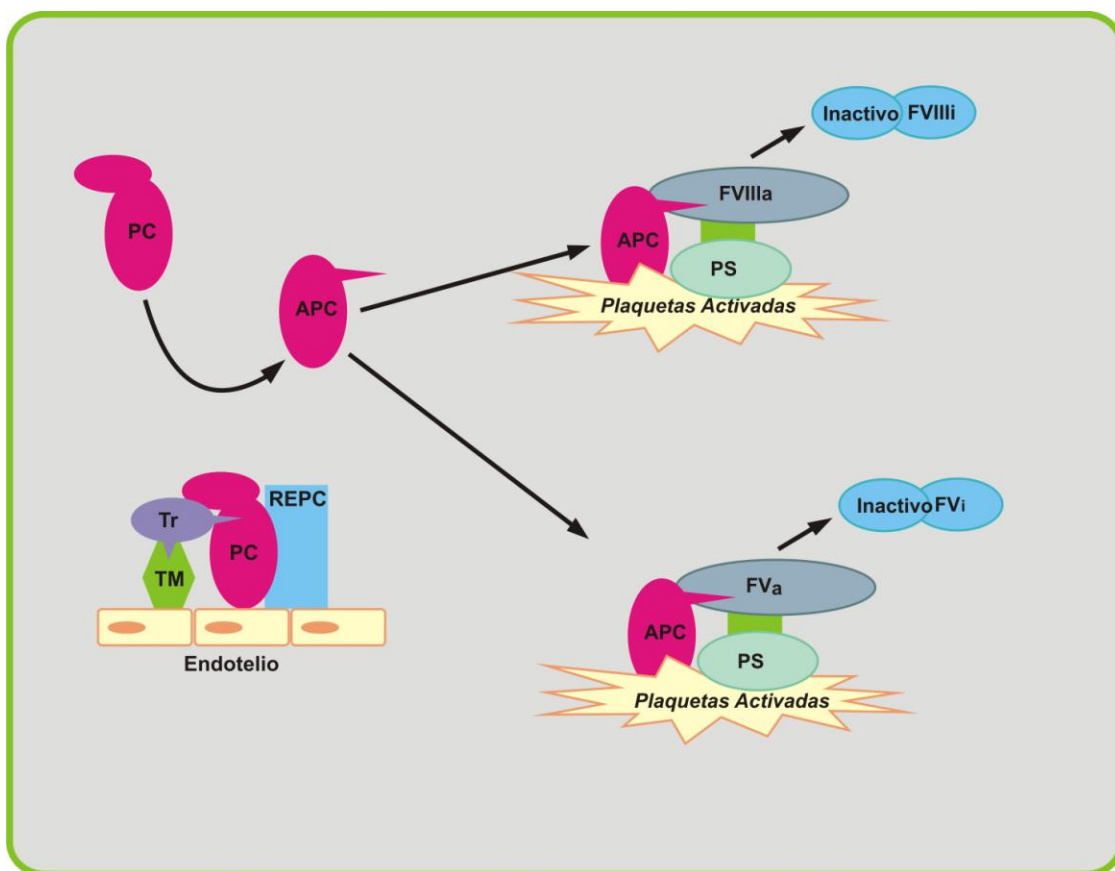


Figura 2. Vía de la Proteína C

ACP=Proteína C activada; TM=trombomodulina; Thr=trombina; REPC=receptor endotelial de la proteína C; FVa = factor V activado; FVIIIa = factor VIII activado; PS=Proteína S. Adaptado de McPherson & Pincus: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 21st ed.

La antitrombina (formalmente llamada antitrombina III) es una proteína inhibidora circulante del plasma que regula a la trombina y al factor Xa y en menor proporción a los factores IXa, XIa, XIIa y VIIA. Su función se ve incrementada en las células endoteliales por glicosaminoglicanos tales como el heparán sulfato, dermatán sulfato y farmacológicamente por la heparina (Figura 3) (2).

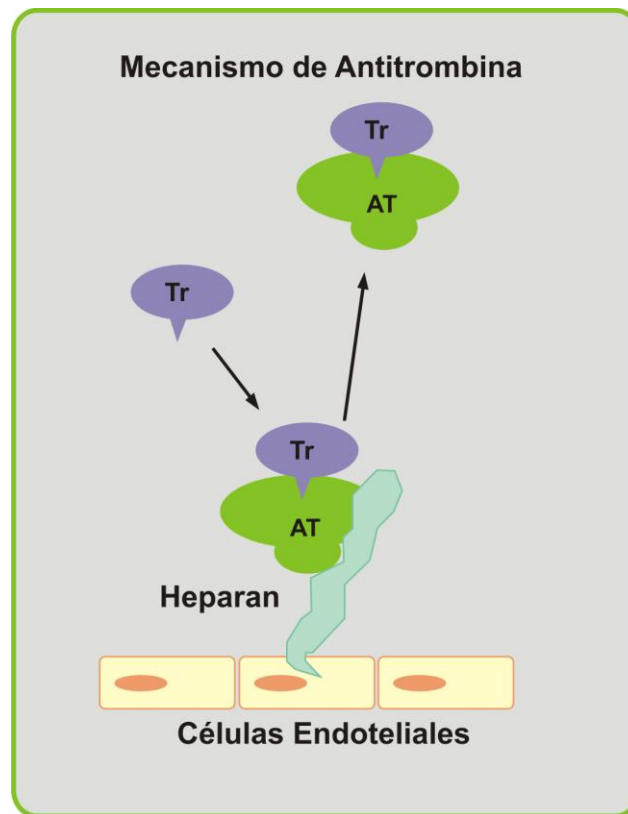


Figura 3. Mecanismos inhibidores de la antitrombina

AT=antitrombina; Heparan= Heparina; AT= antitrombina; Thr= trombina.

Tomado de McPherson & Pincus: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 21st ed.



### 4.3 FACTORES DE RIESGO

El tromboembolismo venoso a menudo resulta de las interacciones entre varios factores de riesgo, y el entendimiento de ellos incrementa la posibilidad de diagnóstico para realizar un tratamiento oportuno. La triada de Virchow mencionada anteriormente (estasis, hipercoagulabilidad y disfunción endotelial) promueve la trombogénesis conociéndose ciertos factores de riesgo que alteran uno ó más elementos de ellos; pueden ser de tipo heredado y adquirido y se mencionarán a continuación (6).

#### 4.3.1. Factores de Riesgo adquiridos:

- Cirugía Ortopédica mayor (Reemplazo de cadera o rodilla)

Estudios clínicos aleatorizados han demostrado tasas de trombosis 7 a 14 días después de una cirugía ortopédica mayor en pacientes sin profilaxis hasta de un 60%. También se identificaron signos de embolismo pulmonar hasta en un 28% cuando se realizó una escanografía de ventilación-perfusión de rutina (6)

- Fractura de pelvis, cadera o huesos largos

Los estudios en pacientes con fractura de cadera fueron de los primeros en demostrar la magnitud del riesgo de presentar trombosis venosa. En ocho estudios prospectivos en los cuales se realizó venografía de contraste después de una cirugía por fractura de cadera, se encontró aproximadamente un 50% de trombosis venosa profunda en pacientes sin profilaxis (6).

- Cirugía general mayor

Este término se aplica a pacientes que van a cirugía abdominal o torácica y que requieren anestesia general por lo menos de 30 minutos. Sin trombofilaxis, la incidencia de trombosis fue de aproximadamente 10%-40% entre los pacientes.

- Trauma múltiple y daño a la médula espinal

Geerts y colaboradores encontraron trombosis venosa profunda en un 47% de pacientes con trauma.

- Quimioterapia y malignidad

El cáncer activo fue un factor de riesgo para el 22.3% de personas en un estudio poblacional. La frecuencia de trombosis se incrementó de 2 a 3 veces en pacientes que iban a cirugía por alguna patología tumoral maligna en comparación a aquellos que iban por otro tipo de patología. La administración de quimioterapia

también se ha asociado a un incremento del riesgo. Por ejemplo, mujeres con carcinoma de mama con quimioterapia y cirugía tienen un riesgo aumentado en 3 veces de presentar un evento trombótico en comparación a mujeres cuyo tratamiento es solamente quirúrgico (6).

- Cirugía de rodilla artroscópica

Estos pacientes presentan un riesgo bajo a moderado, dependiendo de la presencia de riesgos adicionales. Cambios adversos en la hemostasis después de una laparoscopia también han sido reportados (6).

- Anticonceptivos orales y embarazo

Un estudio de casos y controles concluyó que la incidencia de trombosis venosa profunda en mujeres jóvenes sin enfermedad tomando anticonceptivos estrogénicos orales es de 1 a 3 por 10000 personas año. El embarazo aumenta este riesgo 5 veces. El embolismo pulmonar es una de las principales causas de mortalidad materna postparto, con una incidencia de 1 caso por cada 1000 nacimientos (6).

- Terapia de Reemplazo Hormonal

Mujeres recibiendo terapia de reemplazo hormonal tienen un aumento del riesgo de 2 a 4 veces de trombosis venosa idiopática en comparación a mujeres sin el tratamiento. En hombres con terapia hormonal para carcinoma de próstata también se ha reportado un aumento del riesgo (6).

- Tromboembolismo venoso previo

Pacientes con un episodio previo de trombosis venosa profunda tienen un riesgo mayor para recurrencia, particularmente cuando están expuestos a condiciones de alto riesgo (cirugías mayores, inmovilidad prolongada). En un estudio de casos y controles pacientes con un episodio previo tenían un OR de 15.6 en comparación a aquellos que no lo tenían (6).

- Inmovilidad prolongada debido a viajes en carro o avión

Reportes de casos sugieren que la mayoría de estos eventos afectan a personas con otros factores adyuvantes o con un episodio previo de tromboembolismo venoso (6).

- Venas várices

La importancia de las venas várices como factor de riesgo independiente es controversial. En general se piensa que es un factor débil para presentar la patología (6).

- Edad

Pacientes mayores de 40 años presentan un riesgo significativo aumentado en comparación a pacientes jóvenes y este riesgo se dobla por cada década subsecuente (6).

- Obesidad

Un estudio de casos y controles en 1272 pacientes mostró que la obesidad presentaba un odds ratio de 2.39 y un riesgo relativo de 1.7% a 3.2% (6).

#### *4.3.2 Factores de riesgo hereditarios*

La resistencia a la proteína C activada (APC), protrombina G20210A, deficiencia de antitrombina, proteína C y S, homocistinuria, hiperhomocisteinemia y el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos constituyen la mayoría de las trombofilias heredadas. Su descubrimiento, clasificación y diagnóstico han sido un reto para la medicina en los últimos años desde el descubrimiento de la primera mutación asociada a trombosis en el año de 1965 (6).

#### 4.4 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS TROMBOFILIAS

En los últimos años, se ha vuelto evidente que la generación de la trombosis implica un proceso dinámico que resulta de la actividad conjunta de los riesgos antes mencionados con las trombofilias heredadas (1,8).

La deficiencia de antitrombina y la disfibrinogenemia fueron las primeras trombofilias en ser descritas, encontrándose en familias en donde varios miembros presentaban trombosis venosa. Posteriormente, deficiencias heterocigotas de la Proteína C y S fueron identificados también como causa de trombofilia heredada. Inicialmente la búsqueda de pacientes con trombosis idiopáticas y alteraciones genéticas fue algo decepcionante porque sólo el 5% de los pacientes las presentaban. La situación cambió dramáticamente en el año de 1993 tras el descubrimiento de la resistencia a la Proteína C activada. En 1996 se encontró que la sustitución de adenina por guanina en el nucleótido 20210 del gen de la protrombina (G202120A) era otra causa de trombofilia. Recientemente los estudios se han enfocado en el efecto de la hiperhomocisteinemia como factor de riesgo tanto heredado como adquirido para el desarrollo de trombosis venosa profunda (1).

El término “Trombofilia Hereditaria” fue inicialmente usado para describir la deficiencia congénita de antitrombina; sin embargo, ahora se usa genéricamente para todos los desórdenes de hipercoagulabilidad causados por un defecto hereditario. De esta manera, se ha propuesto clasificarlas en cinco grandes grupos (8):

Defectos cuantitativos o cualitativos de factores inhibidores de la coagulación: antitrombina, proteína C, proteína S, heparina, cofactor II, y deficiencias de trombomodulina.

1. Aumento en los niveles o ganancia de función de los factores de coagulación: factor V de Leiden, mutación de la protrombina, hiperfibrinogenemia y elevación en los niveles de los factores VII, VIII, IX y XI.
2. Hiperhomocisteinemia: polimorfismos de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)
3. Defectos en el sistema fibrinolítico: plasminógeno, activador del plasminógeno tisular, factor XIII y lipoproteína.
4. Alteraciones en la función plaquetaria

Entre todos los factores congénitos, se hace especial énfasis en tres de ellos: la mutación R506Q del gen del factor V de la coagulación (conocido como factor V de Leiden) y la mutación G20210A del gen de la protrombina, que se han revelado de especial importancia porque se encuentran con más frecuencia en los pacientes con episodios de Trombosis Venosa Profunda (TVP), su prevalencia en la población general (población occidental) es bastante alta y, además, al ser factores hereditarios, el estudio familiar de pacientes portadores puede ser útil como herramienta de prevención. (10)

Por otro lado, estudiar la asociación entre algunas variantes genéticas (polimorfismos de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa-MTHFR) asociadas a niveles elevados de homocisteína y trombosis venosa puede ser informativa para dilucidar si en verdad los niveles altos de ésta juegan un rol crucial en el desarrollo de la patología. (8)

#### *4.4.1 Factor V de Leiden*

El factor V de la coagulación es una proteína esencial en la hemostasis, jugando un rol crucial tanto en la vía procoagulante como anticoagulante. En su forma inactiva, sirve como un cofactor del Factor X activado (FXa) en el complejo de la protrombinasa el cual cataliza la conversión de protrombina en trombina; sin embargo también actúa como cofactor de la proteína C activada (APC) en la regulación de la actividad del Factor VIII activo (8).

El gen que codifica el factor V es de aproximadamente 80 kilobases de tamaño, y se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q23) y consiste de 25 exones y 24 intrones. Su transcripción da origen a un mRNA maduro de 6.8 kb el cual codifica una proteína de 330 kDa que circula en la sangre en una concentración de aproximadamente 21nM (5).

Antes de 1993, la evaluación de las trombofilias heredadas se limitaba a realizar ensayos funcionales para la proteína C, S o deficiencia de antitrombina; esta aproximación cambió en 1993, cuando Dahlback y colaboradores describieron una nueva forma familiar de trombofilia caracterizada por resistencia a la Proteína C activada. Subsecuentemente varios laboratorios reportaron el defecto genético responsable de esta resistencia: una mutación sin sentido (Guanina por Adenina) en el nucleótido 1691 del gen del Factor V. El cambio en el aminoácido resultante, Arginina por Glutamina en la posición 506, ocurre precisamente en uno de los tres sitios donde la APC normalmente cliva e inactiva la forma procoagulante del Factor Va, haciéndose por tanto parcialmente resistente a la acción anticoagulante de la APC y es inactivado aproximadamente a una velocidad diez veces menor de lo normal, resultando en un aumento de la trombina circulante y por tanto a un estado protrombótico (figura 4) (10).



Figura 4. Mecanismo de resistencia a la proteína C activada secundario a la mutación del Factor V (Factor V de Leiden).

Esta alteración en su forma heterocigota genera un aumento del riesgo de presentar un episodio de trombosis venosa de 3 a 7 veces, mientras que para los homocigotos aumenta de 50 a 100 veces (11-13).

En 1998 se descubrieron otras dos mutaciones en el factor V: el FV Hong Kong y el FV de Cambridge los cuales fueron reportados en pacientes con trombosis. Ambas mutaciones son resultado del remplazo de la Arginina 306, en el FV de Hong Kong por una glicina y en el de Cambridge por treonina. Sin embargo, el primero no ha sido asociado a resistencia contra APC (14).

#### *4.4.2 Mutaciones en la Protrombina*

Unos meses después del descubrimiento del Factor V de Leiden, otro importante factor de riesgo protrombótico fue identificado. De hecho, hacia finales de 1996, un estudio mostró que 18% de los pacientes seleccionados con trombosis venosa y cerca de 1% de controles normales tenían un cambio de nucleótidos en la base 20210 del gen de la protrombina (8,15). Ésta, también denominada Factor II de la coagulación, es una proteína dependiente de vitamina K, que en el proceso de coagulación se transforma en trombina (serina proteasa) y en el mismo proceso se encarga de producir fibrina. La protrombina se encuentra codificada en el cromosoma 11 en posición 11p11-q12, el gen de la protrombina posee 14 exones separados por 13 intrones en sentido 5' y una región no traducida en sentido 3' (16).

La mutación 20210 fue descubierta en 1996 por Poort et al. Se debe a un cambio de G por A en la base 20210 en la región no traducida 3' del gen. Los análisis de haplotipos sugieren que la mutación apareció de un único fundador hace 20000 o 30000 años. En Europa, la prevalencia es del 2% con un rango de 0.7-4%. La prevalencia más alta parece encontrarse en las regiones del sur (aproximadamente 1.7%). En los Estados Unidos se estima entre 1 y 2%. La mutación no es común en afroamericanos, asiáticos y nativos americanos (16).

En la primera descripción de la mutación, los portadores heterocigotos presentaban una media plasmática de niveles de protrombina significativamente mayor (1.32 U/mL) comparados con individuos con genotipo silvestre (1.05 u/mL). Por su parte, los homocigotos mutados presentaban niveles de 1.70 u/mL. Un reporte reciente demuestra que la mutación G por A genera una ganancia de función debido a un incremento en el reconocimiento de la señal de clivaje en la región 3'. El resultado final es la acumulación de mRNA y por tanto un aumento en la síntesis de protrombina. Otros han mostrado que los niveles elevados pueden

inhibir la proteína C activada mediada por una inactivación del Factor Va, lo cual llevaría a una intensificación en la generación de trombina después de iniciada la coagulación (16).

Numerosos estudios de casos y controles han demostrado de manera más o menos consistente la asociación entre la mutación y la enfermedad tromboembólica. Poort et al reportó un aumento en el riesgo de casi 3 veces (OR 2.8; 95% IC 1.4-5.6). Desde entonces otros estudios han estimado un riesgo relativo para trombosis venosa entre 2 y 12, estando la mayoría de los estudios en un rango de 2 a 3 (13, 16).

#### 4.4.3 Polimorfismos en la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

La homocisteína es un aminoácido trombogénico, sulfurado, que se forma en el metabolismo de la metionina. Se cataboliza a cisteína por la vía de la transulfuración con la intervención de dos enzimas dependientes de la vitamina B6 (cistationina B sintasa y cistationasa) o puede ser remetilada a metionina, proceso en el que interviene la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).

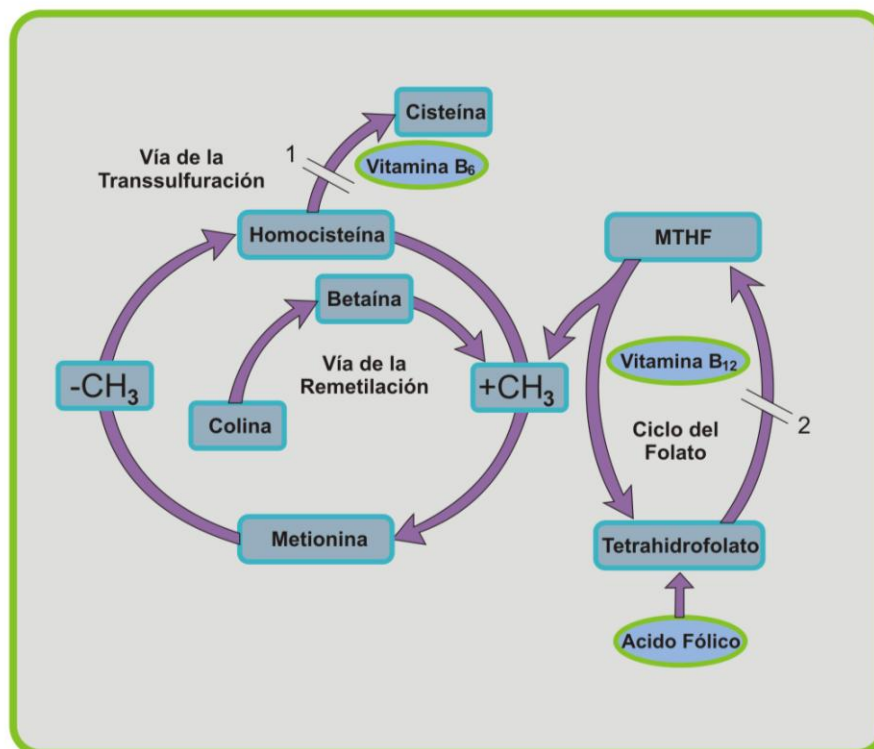


Figura 5. Metabolismo de la homocisteína

En el punto 1 la enzima involucrada es la cistationina beta sintasa; en el punto 2 es la metilentetrahidrofolato reductasa. Adaptado de Key N, McGlennen Ronald. Hyperhomocysteinemia and thrombophilia. Arch Pathol Lab Med 2002;126:1373.

Esta enzima cataliza la conversión de 5,10 metilentetrahidrofolato, en una reacción dependiente de NADPH, a 5-metilentetrahidrofolato; este metabolito que se produce en una reacción fisiológica irreversible, es uno de los tres dadores del grupo metilo en la conversión de homocisteína a metionina por la enzima metionina sintasa (Figura 5) (17-19).

Se han propuesto varias hipótesis acerca de los posibles roles de la homocisteinemia en la enfermedad vascular. Se estudia el efecto en el endotelio secundario al daño por auto oxidación de la homocisteína, alteraciones en las células musculares lisas (respuesta proliferativa y aumento en la producción de colágeno) y otros efectos que se pueda tener en las vías de coagulación como la inducción de la síntesis del factor tisular por parte de los monocitos, activación plaquetaria y biosíntesis de tromboxano. Recientemente se ha reportado que la homocisteína de una manera dosis dependiente puede llevar a alteraciones del factor Va, lo cual resulta en una reducción en su tasa de clivaje por la proteína C activada (19).

El gen de la MTHFR se encuentra localizado en la región cromosómica 1p36. Frosst et al informaron un polimorfismo en el gen que codifica el dominio catalítico de la MTHFR mientras que Brattstron y colaboradores encontraron un alza de 20% en los niveles de homocisteína plasmática en los portadores homocigóticos de este polimorfismo (19).

Esta variante muestra una actividad reducida de la enzima a 37°C y aumenta su termolabilidad a 46°C, de aquí que se refieran a ella como la variante termolábil. Este polimorfismo se debe a una sustitución de C por T en la base 677, el cual codifica a un cambio de aminoácido de alanina por valina. Aproximadamente el 12% de la población en los Estados Unidos es homocigota para esta mutación y la hiperhomocisteinemia típicamente se manifiesta cuando los niveles de folato se encuentran en el extremo inferior de los rangos normales (17-19).

El riesgo que conlleva la presencia de este polimorfismo es de aproximadamente 2.5 veces para presentar un evento de trombosis venosa, sin embargo su asociación al factor V de Leiden se acompaña de un aumento del riesgo y sirve como un ejemplo de la interacción gen-gen en las trombofilias (19,20).



Otras variantes que han sido detectadas incluyen la A1298C que genera un cambio de glutamina por alanina y ha sido implicada en la patogenia de los defectos del tubo neural (21, 22); la T1068C y la T1317C no son clínicamente significativas (19).

#### 4.5 TROMBOFILIA E IMPACTO EN EL EMBARAZO

El aborto es definido como la pérdida del embarazo antes de la semana 20 de gestación y se encuentra asociado a desórdenes genéticos al azar que no recurren en un embarazo subsiguiente. (23) Los abortos recurrentes se definen como la pérdida consecutiva de tres embarazos y la probabilidad clínica de que esto se presente es de aproximadamente 0.8%. En 1996 se hicieron los primeros reportes que establecían una asociación entre esta entidad y algunas trombofilias (25)

La mayoría de estos estudios incluyen el análisis del Factor V de Leiden, protrombina 20210 y MTHFR C677T. En el más grande de ellos desarrollado por Rai et al, se investigó la asociación entre el factor V de Leiden y abortos recurrentes en más de 1000 mujeres caucásicas. En este estudio no se demostró una asociación directa, pero si un aumento en el número de mujeres con resistencia a la proteína C activada en comparación con los controles (25). Sin embargo en el meta análisis de Rey et al, los datos muestran un aumento en los OR de aproximadamente 2 ó más para el Factor V de Leiden. OR similares se han demostrado para portadores de la mutación de protrombina G20210A. Por otra parte los hallazgos relacionados a MTHFR han sido contradictorios (26). Es importante además tener en cuenta el genotipo paterno e incluso el fetal, puesto que estudios prospectivos en parejas en donde cualquiera de los dos tiene la mutación han mostrado un riesgo significativamente alto de aborto comparado con parejas en las cuales ninguno tiene la mutación (27)

Los reportes histomorfológicos han mostrado compromiso de los vasos sanguíneos con trombosis, vascularización de las vellosidades, infartos, fibrosis y vasculopatía decidual. Se ha reportado que estos infartos son más significativos cuando los fetos tenían el alelo del FV de Leiden en comparación a genotipos normales (28).

A pesar de la falta de más estudios prospectivos randomizados en mujeres con abortos recurrentes que tienen un defecto trombofílico, se han hecho tratamientos con anticoagulantes en otro tipo de estudios, usualmente heparina y ocasionalmente aspirina. Uno de estos estudios se realizó en mujeres embarazadas con pérdidas no explicables antes de la semana 10 y con Factor V

de Leiden o mutación en la protrombina. 80 de ellas recibieron 40 mg de enoxaparina subcutáneamente y los controles tomaron 100 mg de aspirina al día. Los resultados mostraron que 86% de las mujeres tratadas con heparina tuvieron un embarazo a término sin problemas en comparación con el grupo control en quienes fue exitoso en tan solo el 29%. (26)

Hasta que haya evidencia más fuerte, es difícil decidir qué tratamiento con heparina debería ser recomendado para mujeres embarazadas con trombofilia y pérdidas recurrentes. Lo que sí es claro es que su administración disminuye significativamente el riesgo de eventos tromboembólicos durante el embarazo, lo cual es particularmente importante para mujeres trombofílicas que no tengan disponible otras alternativas de tratamiento de eficacia probada. (26)

#### 4.6 PRUEBAS GENÉTICAS PARA DETECCIÓN DE ALTERACIONES EN FACTORES DE COAGULACIÓN

Hay varias razones para que los médicos en la práctica diaria soliciten una prueba de trombofilia genética para sus pacientes:

1. Para proveer una explicación de la causa de Tromboembolismo venoso dado el carácter multifactorial de la entidad. Los estudios informan que la sola presencia de una o más factores heredados no es suficiente para explicar la causa de la entidad pero si influyen elevando el riesgo (29).
2. Para establecer el riesgo de recurrencia y determinar la duración de la anticoagulación (29).
3. Para predecir el riesgo en familiares asintomáticos (29).

Dado que durante los últimos 25 años se han venido estudiando las mutaciones en los genes del sistema coagulación/anticoagulación como factores de riesgo para el tromboembolismo venoso, concomitantemente se han estado desarrollando métodos diagnósticos moleculares (30).

Los métodos basados en DNA para detectar este tipo de alteraciones se encuentran ampliamente disponibles en los laboratorios para probar definitivamente la presencia del polimorfismo o mutación, cada uno con ventajas y desventajas a la hora de seleccionarlos y utilizarlos (tabla 1). Entre ellos están aquellos basados en la amplificación genómica por medio de la PCR y los que se basan en otro método:

*Métodos basados en PCR:*

Emplea primers específicos para amplificar la secuencia que contiene la mutación blanca, por ejemplo parte del exón 10 del FV y la parte 3' no traducida en protrombina. Posteriormente los productos de amplificación son corridos en un gel de electroforesis. Una variedad de métodos basados en PCR se han usado para la detección de estas mutaciones. Entre ellos están:

- Restricción por enzimas de digestión: Este método se basa en que las mutaciones o los SNPs pueden abolir o crear sitios de restricción para una enzima determinada, permitiendo discriminar el genotipo por visualización de los fragmentos de diferentes tamaños al separarlos por electroforesis en agarosa o acrilamida. Si más de una mutación va a ser detectada en una múltiplex, los fragmentos digeridos deben ser de un tamaño suficiente para permitir una interpretación clara y simple del gel (30).
- Amplification-refractory mutation system (ARMS): es una técnica múltiplex en donde los alelos silvestres y mutados son amplificados concomitantemente con primers específicos para cada genotipo con producción de amplicones específicos de diferente tamaño molecular. Los productos son detectados por electroforesis en agarosa o acrilamida (30).

Método	Prueba	Ventajas	Desventajas
Basados en PCR	RED-PCR múltiplex	Ampliamente disponible, precisa y efectiva	Multipasos; ensayo manual. Riesgo de mala interpretación con la presencia de múltiples bandas
	ARMS	No requiere enzimas de digestión para restricción	Riesgo de toxicidad con bromuro de etidio (si se usa)
	SSCP	Puede detectar mutaciones inusuales	Falta de especificidad. Discriminación pobre de otras mutaciones
	ELISA	Sencillo	Ensayo manual
	FRET	Resultados disponibles en menos de 2 horas. Muy sensible. Puede	Alto costo del equipo. Mayor riesgo de contaminación

		detectar mutaciones inusuales	
	Secuenciamiento	Sencillo y rápido	Alto costo
	Microarray	Completamente automatizado	Necesita DNA purificado
<b>No basados en PCR</b>	Invader	Sencillo, de fácil interpretación con su software	Requiere alta concentración de DNA purificado

Tabla 1. Métodos disponibles para la detección de Factor V de Leiden y Factor II G20210A.

PCR=reacción en cadena de la polimerasa; FRET= transferencia de energía por resonancia de fluorescencia; RED= digestión por enzimas de restricción; ARMS= sistema de amplificación refractaria mutacional; SSCP= polimorfismo conformacional de cadena única; ELISA= ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Tomado de Cooper P..C, Rezende S.M. An overview of methods for detection of factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation (30).

- Polimorfismo conformacional de cadena única (SSCP): El DNA amplificado es denaturado a cadenas únicas y luego analizado por electroforesis. La movilidad de la molécula depende de la longitud del amplicón, del peso molecular y en general por su conformación, la cual está determinada por la secuencia de nucleótidos (31)
- Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas: se hibrida un producto biotinilado de PCR con un oligonucleótido en una placa con pozos. El conjugado de estreptavidina-peroxidasa es añadido y finalmente, un buffer de peróxido de hidrógeno con cromóforos detectan el amplicón unido. Al comparar la densidad del color generada entre las reacciones de los alelos silvestres y mutados con las sondas de oligonucleótidos se determina el genotipo (30).
- Identificación por Fluorescencia de fragmentos de PCR por Real Time PCR: los genotipos son detectados al comparar las temperaturas melting puesto que la del alelo mutado ocurre a una temperatura inferior que la del alelo silvestre (30).
- Secuenciamiento directo de DNA: específicamente la pirosecuenciación es la que se ha usado para detectar estas mutaciones. La reacción es

monitoreada con la liberación de pirofosfato con conversión a ATP y detección por la reacción de luciferin-luciferasa (30).

#### Métodos no basados en PCR

- Invader Assay: Este método utiliza la enzima clivasa, un tipo de nucleasa que cliva las regiones no apareadas del DNA de al menos 1 pb. Independientemente del genotipo, dos sondas de oligonucleótidos llamadas Invasora y Primaria se unen y se disocian continuamente de una hebra blanco de DNA a 63°C (30)

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 5.1 DISEÑO

Casos y controles de base poblacional

### 5.2 POBLACIÓN A ESTUDIO

Definición de caso: pacientes remitidos por los servicios de hematología, gineco-obstetricia y neurología de distintas clínicas de la ciudad de Bogotá, que hubiesen presentado por lo menos un evento tromboembólico (ETE) ya sea accidente cerebro vascular (ACV), Trombosis venosa profunda (TVP), o tromboembolismo pulmonar (TEP) sin otros factores de riesgo o haber presentado pérdida gestacional recurrente (PGR) sin causa etiológica aparente.

Controles: individuos caucásico-mestizos tomados del proyecto **“ANÁLISIS MUTACIONAL DEL FACTOR V G1691A, PROTROMBINA G20210A, MTHFR C677T Y A1298C EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON HISTORIA CLÍNICA DE TROMBOFILIA Y EN UNA MUESTRA DE LOS PRINCIPALES GRUPOS POBLACIONALES COLOMBIANOS “**

### 5.3 MÉTODOS

Extracción de DNA.

El ADN fue extraído de las muestras de sangre periférica por el método de Salting Out mediante la utilización del kit Wizard® Genomic “DNA Purification Kit” Cat A1125. El ADN extraído fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

Genotipificación.

Todas las mutaciones se identificaron mediante amplificación por PCR seguida de restricción con enzimas de digestión. La Tabla 3 presenta la información de secuencia de los primers, el tamaño del amplicón, la enzima de restricción empleada para cada caso, y el tamaño de los productos de digestión.

El Factor V G1691A (Factor V Leiden) y el Factor II (Protrombina) G20210A fueron amplificados por PCR en una reacción múltiple mediante el procedimiento descrito por Koxsal (31) con algunas modificaciones. En breve, 5 ul de ADN genómico se amplificaron en un volumen de 50 ul, 1.4 mM de los primers FV, 0.25 mM de los primers para FII, 0.2 mM de cada dNTP, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 1.25 unidades de Go Taq DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, WI). Los parámetros de amplificación consistieron en un ciclo de denaturación inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 seg, apareamiento de los primers a 57°C por 30 seg y extensión a 72°C por 30 seg, seguido de extensión final de 10 min a 72°C. El tamaño de los productos de PCR fueron verificados en geles de agarosa Sekeam al 2% (Seakem® LE Agarose, LONZA Cat# 50004) (ver tabla 2 y figura 6).

La amplificación por PCR para MTHFR C677T y A1298C se realizaron por separado utilizando 2.5 ul de ADN, primers a 0.50 mM, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 1.25 u de Go Taq polimerasa (Promega Corporation, Madison, WI). Los parámetros de amplificación para C677T fueron los descritos por Frost et al (32) consistentes en denaturación inicial 94°C por 3 min, 33 ciclos con denaturación a 94°C 30 seg, apareamiento a 59°C por 30 seg, y extensión a 72°C por 30 seg, seguida de extensión final de 3 min a 72°C. Para la mutación A1298C las condiciones de amplificación corresponden a las descritas por van der Put et al. (21) con una denaturación inicial 92°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de 92°C por 60 segundos (denaturación), 51° por 60 segundos y 72°C por 30 segundos con una extensión final de 72° por 7 minutos. El tamaño de los productos de PCR fue verificado en geles de agarosa Sekeam al 2% (ver tabla 2 y figuras 7 y 8).

Un total de 15 ul del producto de amplificación para Factor V Leiden y Protrombina fueron digeridos con 5 U de Mnl I (New England Biolabs R0163), 1X Buffer de enzima y 1X BSA en un volumen final de 20 ul. Los fragmentos de restricción fueron resueltos en geles de agarosa NuSieve al 3% (NuSieve® GTG® Agarose, Cambrex Cat #50084) en 1X TBE (ver tabla 2 y figura 9). Para la mutación MTHFR C677T se utilizó la enzima de restricción Hinf I (5 u) (New England Biolabs R0155) y para la MTHFR A1298C se utilizó la enzima Mbo II (10 U) (New England Biolabs R0148) en un volumen final de 20 ul, 1X buffer y 1X BSA. Los fragmentos de restricción fueron resueltos en geles de agarosa 1X TBE, NuSieve al 3% (Ver

tabla 2 y figura 10). Para A1298C los productos de restricción de fueron resueltos en geles de agarosa al 6% en 1X TBE Methaphor 40% (Methapor® Agarose FMC Cat#50180), NuSieve al 30% y Seakem 30% (Ver tabla 2 y figura 11).

#### 5.4 ANÁLISIS DE DATOS

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de cada mutación. Adicionalmente se evaluó el equilibrio Hardy-Weinberg para cada una.

Las variables categóricas se describieron mediante tablas de frecuencias y se utilizó la prueba de  $\chi^2$  o el test exacto de Fisher para las pruebas de hipótesis según el caso. Las variables continuas se describieron en términos de media y desviación estándar.

La magnitud de la asociación entre mutación y caso se expresó como Odds Ratio e intervalos de confianza del 95%. Todos los análisis se realizaron con el software estadístico Stata versión 10 (Statacorp)

Mutación	Secuencia de Primer	Producto PCR	Enzima de Restricción	Homocigoto Normal	Heterocigoto	Homocigoto Mutado
<b>FV G1691A</b>	5'-CATCGCCTCTGGGCTAATA-3' 5'-TTGAAGGAAATGCCCATTA-3'	168pb	Mnl I	115/37/17	152/115/37/17	152/17
<b>FII G20210A</b>	5'-ATGGGGTGAAGGCTGTGACC-3' 5'-AGCACTGGGAGCATTGAGCCT-3'	221pb	Mnl I	192/29	221/192/29	221
<b>MTHFR C677T</b>	5'-ATCAGAGCCCCAAAGCAGA-3' 5'-CAGCCTCAAAGAAAAGCTGC-3'	225 pb	Hinf I	203	203/180	180
<b>MTHFR A1298C</b>	5'- CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC- 3' 5'- CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG-3'	163pb	Mbo II	56/31-30/28	84/56/31- 30/28	84/31-30/28

Tabla 2. Primers usados para la amplificación del DNA y tamaño de los amplicones en la PCR y en la restricción.



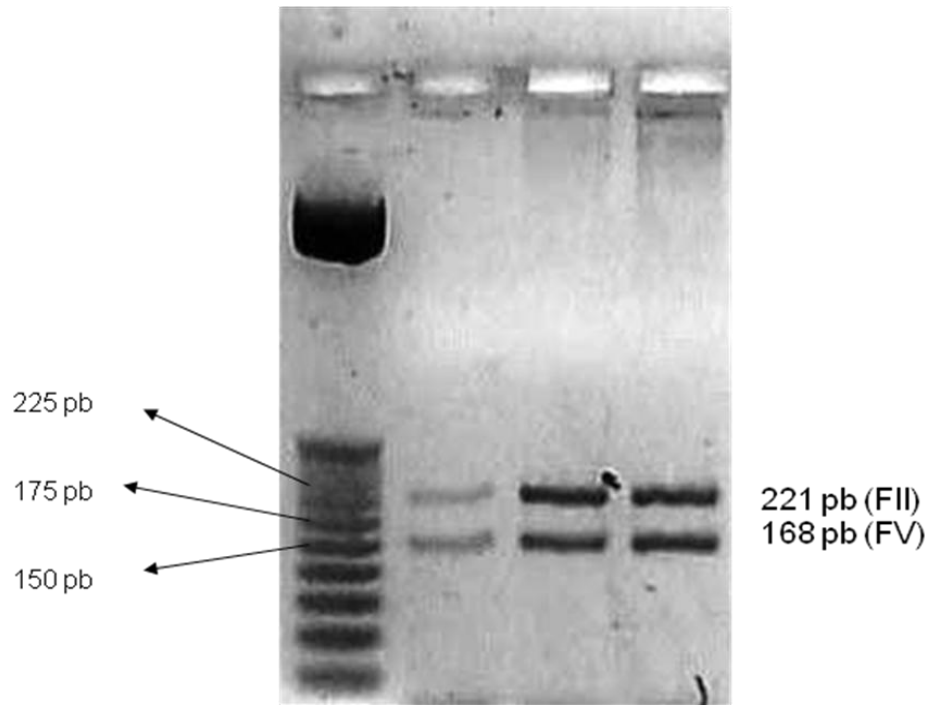


Figura 6. Productos de amplificación Factor II y V

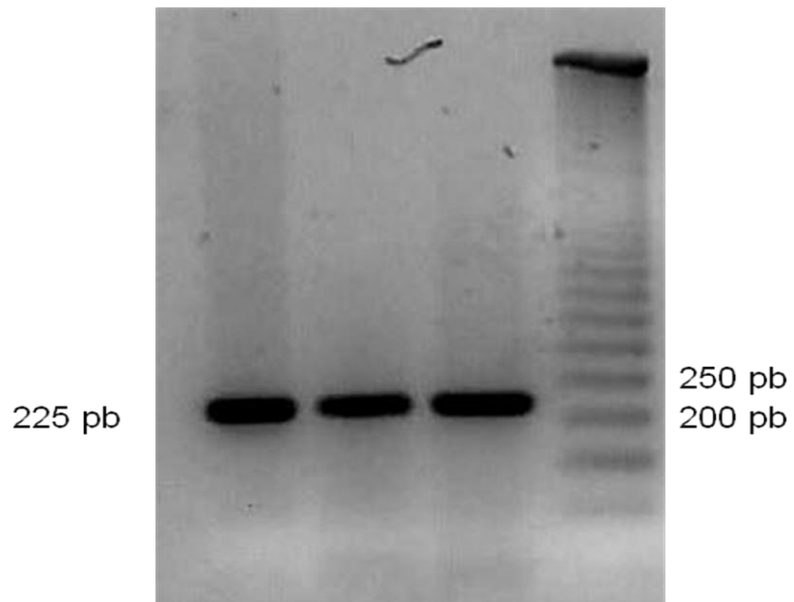


Figura 7. Producto de amplificación para MTHFR C677T

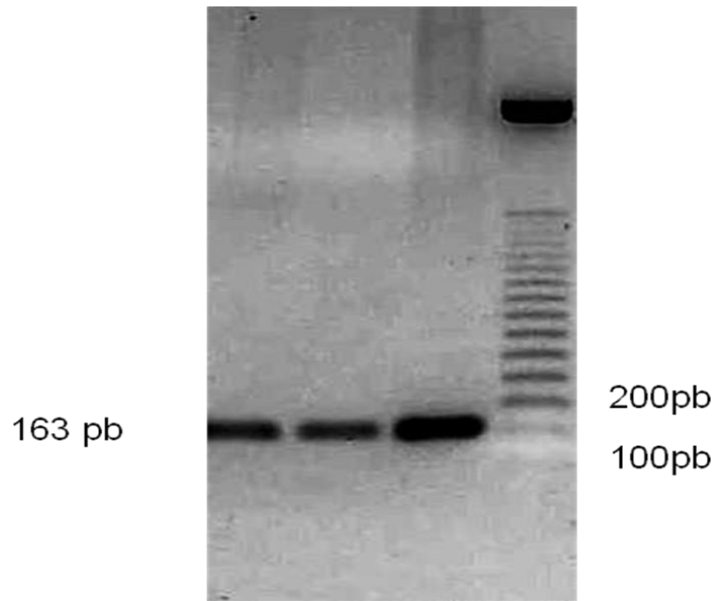


Figura 8. Producto de amplificación para MTHFR A1298C

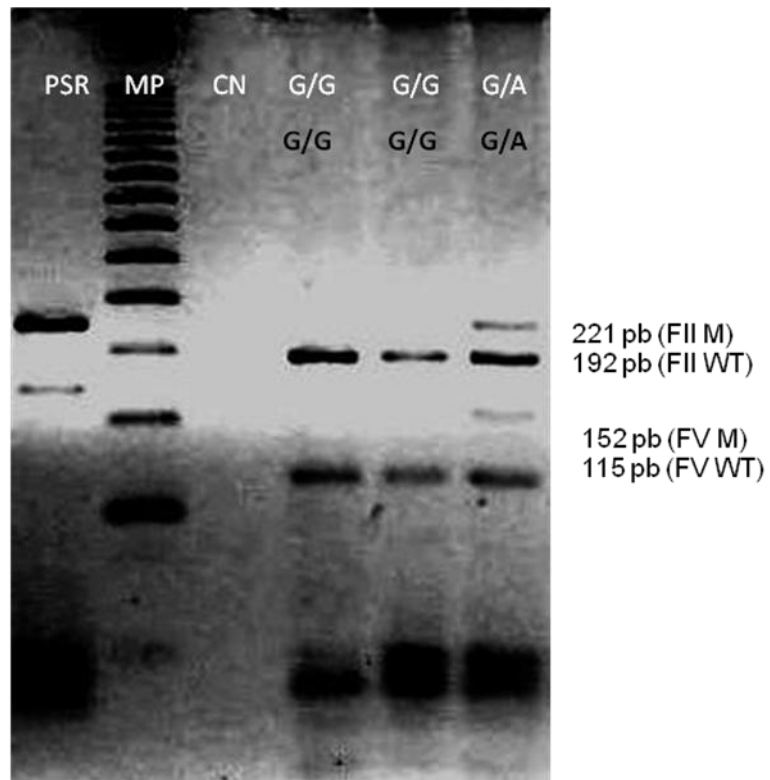


Figura 9. Productos de restricción Factor II y V

A. Factor V y Factor II en blanco genotipo para factor II, en negro genotipo para factor V G: alelo normal, A: alelo mutado; PSR: producto sin restringir; MP: marcador de peso

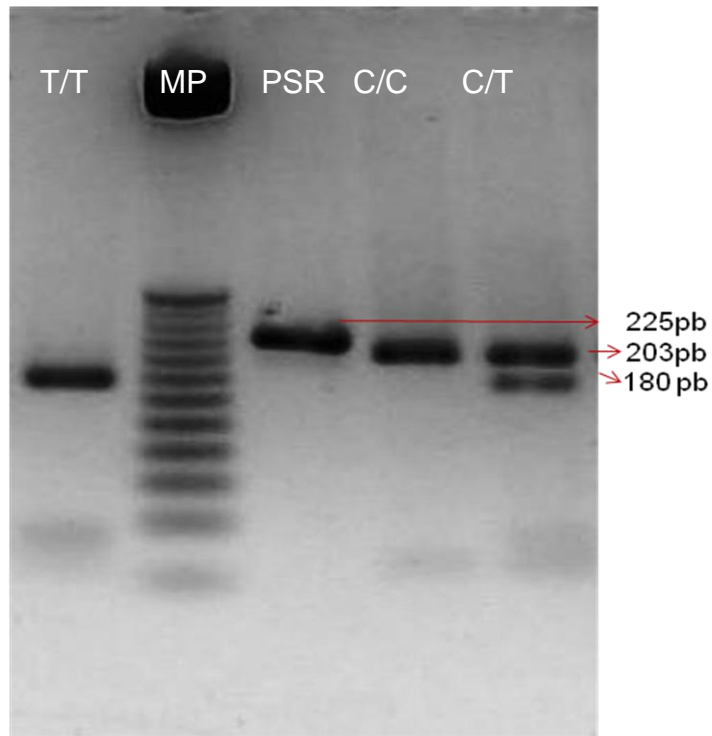


Figura 10. Productos de restricción MTHFR C677T

C: alelo normal, T: alelo mutado PSR: producto sin restringir; MP: marcador de peso

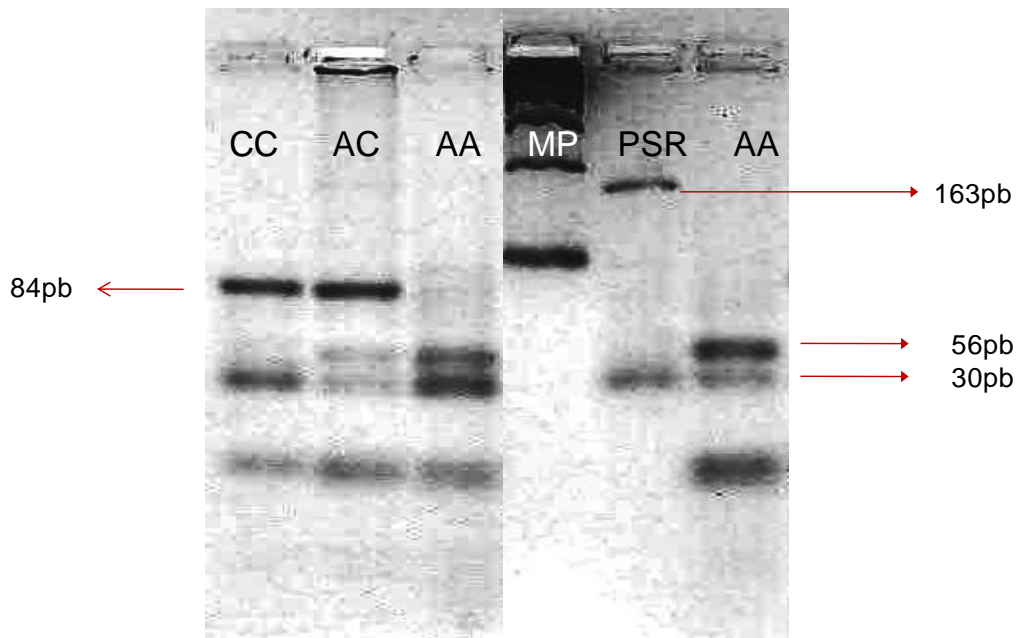


Figura 11. Productos de restricción MTHFR A1298C

A: alelo normal, C: alelo mutado PSR: producto sin restringir; MP: marcador de peso

## 6. RESULTADOS

Se estudiaron un total de 328 muestras, provenientes de 128 casos y 200 controles. Se encontró que del total de los pacientes 111 presentaron enfermedad tromboembólica y 17 mujeres se estudiaron por tener pérdida gestacional recurrente.

Del total de pacientes, 31.25% eran de sexo masculino, con una edad promedio de 26 años (rango 8 meses a 68 años) y 68.75% de sexo femenino, con una media de edad de 31 años (rango 1 mes a 67 años). Un 63.96% de las mujeres presentaron evento tromboembólico, mientras que las restantes fueron remitidas por PGR.

### **Factor V de Leiden**

Se encontró heterocigosidad para la mutación en el 17% de los casos y 1.5% de los controles. No se registraron casos ni controles homocigotos para la alteración.

La mutación se encontraba en equilibrio de HW para ambos grupos ( $p= 1.0$ ) y se asoció fuertemente con la presencia de enfermedad (OR 15.97, IC95% 4.7 a 54). Al estratificar por patología se identificó una fuerte asociación con las pacientes que presentaban pérdida gestacional recurrente (OR 8.75, IC95% 1.35-56-50)

Las frecuencias alélicas se muestran en la Tabla 3.

### **Protrombina G20210A**

Se encontró heterocigosidad para la mutación en el 1.6% de los casos y en ningún control. No se registraron casos ni controles homocigotos para la alteración. La mutación en los casos se encontró en equilibrio de Hardy Weinberg ( $p=1.0$ ). La ausencia de mutaciones en el grupo control impide calcular el Odds Ratio.

### **MTHFR C677T**

Se encontró heterocigosidad para la mutación en el 52% de los casos y en el 50% de los controles. En este polimorfismo se registró homocigosidad en el 19% de los casos y en el 24% de los controles. El equilibrio de Hardy-Weinberg en ambos

grupos se mantuvo ( $p=1.0$ ) y no hubo asociación con la presencia de enfermedad (OR 0.92, IC95% 0.55 a 1.52) aún al estratificar el grupo control por patología.

### MTHFR A1298C

Para el polimorfismo A1298C la heterocigosidad se encontró en el 28% de los casos y en el 20% de los controles; la homocigosidad para la mutación se identificó en el 4% de los casos y el 5% de los controles. El equilibrio de Hardy-Weinberg se mantuvo en el grupo de casos ( $p=0.532$ ) pero se observó alterado en el grupo control ( $p=0.0026$ ). No hubo asociación con la presencia de enfermedad cuando se analizó la totalidad de los pacientes (OR 1.40, IC95% 0.85 a 2.33); sin embargo al estratificarlos por patología se detectó una asociación con las mujeres que presentaban pérdida gestacional recurrente (OR 4.06 IC95% 1.47-11.23).

Población	n	Factor V G1691A		Factor II G20210A		MTHFR C677T N/A		MTHFR A1298C <sup>†</sup>	
		G	A	G	A	C	T	A	C
Controles	200	397	3	400	0	204	196	337	63
		(0.9925)	(0.0075)	(1.0000)	(0.0000)	(0.5100)	(0.4900)	(0.8425)	(0.1575)
Pacientes	128	234	22	254	2	139	115	182	42
		(0.9141)	(0.0859)	(0.9922)	(0.0078)	(0.5472)	(0.4528)	(0.8125)	(0.1875)

Tabla 3. Frecuencias alélicas en Factor V de Leiden, Factor II (protrombina G20210), MTHFR C677T y A1298

Adicionalmente se realizó un análisis estratificado para evaluar si la presencia de una mutación en MTHFR potenciaba la asociación existente entre la alteración del factor V y la presencia de enfermedad. Se identificó entonces que el OR de los pacientes con mutación en el Factor V sin la presencia de MTHFR C677T era de 10.6 (IC95% 1.17 a 494) mientras que en aquellos que si la tenían aumentó a 19 (IC95%; 4.3 a 170.7).

El mismo análisis se realizó para el polimorfismo A1298C. Los individuos con Factor V de Leiden y sin el polimorfismo presentaban un OR de 15.3 (IC 95%; 3.3-142) mientras que en aquellos con ambas alteraciones incrementa a 21.6 (IC95%; 2.8-946.2).

Esto indica una clara tendencia hacia una interacción entre la mutación del Factor V y los polimorfismos de la enzima.

## 7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se investigó la asociación del FV de Leiden, protrombina G20210A y MTHFR C677T y A1298C con la presencia de trombosis venosa profunda, identificándose un aumento del riesgo de casi 16 veces cuando se tiene la mutación en el Factor V. La frecuencia genotípica en este caso también fue mayor encontrándose de 19.3% en pacientes contra un 1.5% en los controles. Esto concuerda con reportes previos en los cuales se ha documentado la asociación del Factor V y la carencia o menor asociación de los otros polimorfismos a menos que estén combinados con otro factor de riesgo (11,12)

Esto se evidencia por ejemplo, en el “Physicians Health study” en donde se encontró un 12% de incidencia de heterocigosidad para la mutación en pacientes en comparación a un 6% en los controles. La incidencia alcanzó un pico en 31 hombres mayores de 60 años sin factores de riesgo adicionales (12).

Por otra parte, el estudio de trombofilia de Leiden, que consistía en 471 pacientes menores de 70 años y 474 controles sanos, encontró una incidencia de resistencia a la APC en el 21% de los pacientes en comparación a un 5% de los controles. La incidencia de la heterocigosidad (18% vs 3%) fue mayor en los pacientes que en los controles en concordancia con lo reportado en este trabajo (12). En Colombia, Varela y colaboradores, reportaron en donantes de sangre una prevalencia de la mutación del 1.4%, lo cual concuerda con lo encontrado en este proyecto (33).

La asociación con trombosis venosa profunda en el estudio de Trombofilia, fue de 7 veces en los heterocigotos contra un 16 reportado en el presente (12).

La mutación de la protrombina G20210A se describió originalmente en la población danesa, donde la prevalencia encontrada fue del 2.3% en controles sanos, 6.2% en pacientes no seleccionados con trombosis venosa profunda y 18% en pacientes seleccionados con historia familiar. Se ha identificado una mayor prevalencia de la mutación en Europa del sur (2.6%-6.5%) en comparación a lo reportado para Europa del Norte. En el estudio actual se observó la mutación en estado heterocigoto en 2 pacientes y en ningún control. Esto es acorde a lo reportado por Torres y colaboradores en Colombia, en donde se reportaron 3 pacientes heterocigotos, un homocigoto y ningún control con la mutación (3,16).

Ya que los datos de prevalencia en las poblaciones Amerindia y africana son extremadamente bajas, la prevalencia en la población Colombiana podría

explicarse por la mezcla de la población con los Españoles en donde la frecuencia ha llegado a reportarse de hasta 6.5% (3). Respecto al riesgo de desarrollar TVP en pacientes con esta mutación, los datos de Poort y Girolami informan un aumento en el riesgo de hasta 2 y 3 veces; en el estudio actual no es posible hacer cálculos de riesgo dada la ausencia de mutaciones en el grupo control (15).

Los polimorfismos de MTHFR siempre han estado rodeados de controversias. Múltiples estudios de casos y controles han mostrado asociaciones entre trombosis arterial y venosa y los niveles de homocisteína en sangre; sin embargo, los resultados son contradictorios cuando se comparan con la prevalencia homocigótica, en especial de MTHFR C677T (20). Un reciente meta análisis concluyó que a pesar de que la mutación causa leve hiperhomocisteinemia, no hay un aumento del riesgo cardiovascular. Actualmente es generalmente aceptado que éste polimorfismo por sí solo no es un factor de riesgo para desarrollar una trombosis, pero si podría tenerse en cuenta como un factor de sinergismo con otras condiciones trombofílicas. La frecuencia en este estudio del genotipo homocigoto fue de 19% en los pacientes y 24% en los controles; los heterocigotos por su parte, presentaron frecuencias similares en los pacientes y en los controles de 52% y 50% respectivamente; estos datos coinciden relativamente con el estudio previo en Colombia de Torres y colaboradores en los cuales reportan una homocigocidad de 24% en los pacientes y 19.3% en los controles; la heterocigosidad se detectó en un 52% en los pacientes y en un 50% en los controles (3, 20). Dado estos resultados el riesgo de presentar un evento tromboembólico con la presencia de este polimorfismo no puede establecerse debido a la alta frecuencia de la alteración en la población sana. De la misma manera, la presencia del polimorfismo A1298C se encuentra distribuida ampliamente en los individuos sin patología, siendo éste el primer estudio que reporta la frecuencia genotípica en Colombia y Latinoamérica; sin embargo, al categorizar las patologías, se evidencia que las pacientes con pérdida gestacional recurrente presentan un aumento del riesgo de hasta 4 veces cuando tienen el polimorfismo. Los escasos trabajos sobre éste hacen muy difícil concluir la significancia del hallazgo; Van der Put y colaboradores reportan un riesgo relativo aún menor que lo identificado para C677T cuando hicieron el análisis en el contexto de presencia de defectos del tubo neural (22). No hay estudios similares en Colombia o Suramérica.

Respecto a la asociación encontrada encontrada en este estudio entre el polimorfismo MTHFR A1298C y las pacientes con pérdida gestacional recurrente, diversos estudios han mostrado resultados contradictorios, algunos mostrando un aumento del riesgo en 2.5 veces y otros incluso han insinuado que este polimorfismo no contribuye significativamente a la hiperhomocisteinemia ni



siquiera en combinación con el polimorfismo C677T e incluso se ha cuestionado su efecto fenotípico desde el punto de vista bioquímico(23-26). Sin embargo, debe tenerse siempre presente que la ausencia de un fenotipo in vitro no necesariamente descarta la posibilidad de su importancia in vivo, por ejemplo durante momentos con altos requerimientos de folato como el embarazo. Un metanálisis mostró una disminución en los niveles de homocisteína en un 25% al administrar una dosis diaria de ácido fólico entre 0.5 mg y 5 mg (25). Se requieren más estudios con un número mayor de pacientes para establecer si existe realmente una asociación y aún más, si la administración del medicamento disminuye la tasa de pérdidas gestacionales recurrentes, lo que sería de gran relevancia clínica e importancia en la salud pública.

Respecto al equilibrio de Hardy Weinberg los resultados fueron los esperados para el factor V. Varios estudios en diferentes contextos clínicos (carcinoma endometrial, sepsis, enfermedad tromboembólica, estudios de reproducción asistida) y en diferentes poblaciones han mostrado equilibrio del polimorfismo (34-37).

Por otro lado, el desequilibrio que se evidenció en el polimorfismo de MTHFR A1298C no puede explicarse en esta situación puesto que no se ha presentado en la población estudiada alteraciones de tipo selección natural o migraciones.

Finalmente, se hace necesario comentar la tendencia hacia una interacción entre la mutación del Factor V y los polimorfismos de MTHFR. La mutación ocurre comúnmente y puede ser coheredada con otras trombofilias como deficiencias de la proteína C, proteína S, antitrombina, protrombina G20210A y MTHFR C677T al igual que lo encontrado en este trabajo. Además se observa un aumento en sus OR. Por ejemplo, un análisis de 8 estudios de casos y controles reportó un OR en pacientes con FV de Leiden y Protrombina G0210A de 20 (IC95%; 11-36) comparado con el OR de 4.9 (IC95%;4.1-5.9) para aquellos solo con Factor V de Leiden y el OR de 3.8 (IC95%; 3.0-4.9) en los que tenían solo Protrombina G20210A (11).

Al parecer las personas que tienen dos defectos presentan un mayor riesgo para desarrollar un evento trombótico que sus familiares con uno solo. En una revisión de 4 estudios, aproximadamente el 75% de los miembros de una familia con dos defectos presentaron el evento en comparación al 10% de aquellos que solo presentaban una alteración, de lo que se infiere que el aumento del riesgo fue de aproximadamente 3 veces (11).

El riesgo de trombosis también se ha visto incrementado cuando los pacientes presentan concomitantemente hiperhomocisteinemia. El estudio de Ridker y colaboradores en donde se evaluaron pacientes con trombosis venosa idiopática

reportó un aumento del riesgo de 3.4 veces con hiperhomocisteinemia, 2.3 veces con el Factor V de Leiden y 21.6 veces con ambos desórdenes (3, 38). Estos datos se correlacionan con los hallados en este estudio.

En resumen, este trabajo permitió conocer la frecuencia genotípica de las mutaciones en el Factor V, en el Factor II y en los polimorfismos de MTHFR C677T y A1298C, compararlas con estudios previos encontrando concordancia, inferir riesgo de trombosis venosa profunda en pacientes con dichas alteraciones detectando una mutación con una fuerte asociación (Factor V de Leiden) en pacientes con eventos trombóticos y otra (MTHFR A1298C) en mujeres con pérdida gestacional recurrente.

También se reportó una tendencia hacia la interacción entre el Factor V de Leiden y los polimorfismos de MTHFR C677T en correspondencia con estudios previos.

Se requieren estudios prospectivos en los que se determinen si un tratamiento preventivo con anticoagulación en pacientes con las mutaciones, realmente pueda prevenir la aparición de nuevos eventos, y mejor aún evitar el desarrollo de los mismos en pacientes con las alteraciones sin historia clínica de la enfermedad.

## 8. CONCLUSIONES

1. Este trabajo permitió conocer la frecuencia genotípica de las mutaciones en el FV, en el Factor II y los polimorfismos de MTHFR C677T y A1298C comparando con la literatura mundial y otros reportes colombianos encontrando concordancia con ellos.
2. Se detectó una fuerte asociación del FV de Leiden en pacientes con eventos tromboembólicos, mayores a lo reportado mundialmente y a su vez se encontró una tendencia hacia la interacción con los polimorfismos de MTHFR.
3. Se evidenció una asociación entre el polimorfismo de MTHFR A1298C y pérdidas gestacionales recurrentes
4. Es necesario la realización de estudios prospectivos en los que se determine si un tratamiento preventivo con anticoagulantes en pacientes con las mutaciones realmente prevengan la aparición de nuevos eventos o evitar el desarrollo de los mismos en pacientes con las alteraciones pero sin historia de enfermedad

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med.* 2001; 344(16): 1222-1231
2. Miller JL. Hemostasis and Thrombosis. En *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* Saunders Elsevier. Ed 21. 2007: 729-746
3. Torres JD, Cardona H, Alvarez L, et al. Inherited Thrombophilia is associated with deep vein thrombosis in a Colombian population. *Am J Hematol* 2006; 81: 933-37
4. López JA, Kearon C, Lee A. Deep venous thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004:439-56
5. Segers K, Dahlbäck B, Nicolaes G. Coagulation factor V and thrombophilia: Background and mechanisms. *Thromb Haemost* 2007; 98: 530–42.
6. Osinbowale O, Ali L, Chi YW. Venous thromboembolism: a clinical review. *Postgrad Med.* 2010 Mar;122(2):54-65.
7. Blann AD, Lip GY. Venous thromboembolism. *BMJ* 2006;332:215-9
8. Franchini M, Veneri D, Salvagno GL, et al. Inherited thrombophilia. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2006;43(3):249-290.
9. Nemerson Y, Nassel H. The biology of thrombosis. *Ann. Rev. Med.* 1982; 33: 479-88
10. Carmona-Berriguete S, Arroyo-Bielsa A, Barrio-Rodríguez CA, et al. Características de la trombosis venosa profunda en pacientes con Factor V de Leiden y mutación G20210A del gen de la protrombina. *Angiología.* 2003; 55 (4):322-330
11. Press RD, Bauer KA, Kujovich JL, et al. Clinical Utility of Factor V Leiden (R506Q) Testing for the Diagnosis and Management of Thromboembolic Disorders. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126:1304–1318
12. Rossendorf A, Dorfman DM. Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131:866–871

13. Segal JB, Brotman DJ, Necochea AJ, et al. Predictive value of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A in adults with venous thromboembolism and in Family members of those with a mutation. A systematic review. *JAMA*. 2009;301:2472-2483
14. Norstrem E, Thorelli E, Dhalbäck B. Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. *Blood*. 2002 Jul 15;100(2):524-30.
15. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-703.
16. McGlennen R, Key NS. Clinical and Laboratory Management of the Prothrombin G20210A Mutation. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126:1319–1325
17. Bermúdez M, Briceño I, Gil F, et al. Homocisteína y polimorfismos de cistationina B sintasa y metilentetrahidrofolato reductasa en población sana de Colombia. *Colomb Med*. 2006; 37:46-52
18. Ayala C, García R, Cruz E, et al. Niveles de homocisteína y polimorfismos de los genes de la MTHFR y la CBS en pacientes colombianos con trombosis venosa superficial y profunda. *Biomédica* 2010;30:259-67
19. Key NS, McGlennen RC. Hyperhomocysteinemia and Thrombophilia. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126:1367–1375
20. Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of Publisher epidemiological studies. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 292–9
21. Weisberg I, Tran P, Christensen B, et al. A Second Genetic Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity. *Mol Genet Metab*. 1998 Jul;64(3):169-72.
22. Van der Put, N., F. Gabreëls, E. Stevens, J. A. M. Smeitink, F. Tribels, T. Eskes, L, van den Heuvel & H. Blom. A Second Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects? *Am. J. Hum. Genet*. 62;000-000, 1998
23. Pabinger I, Vormittag R. Thrombophilia and pregnancy outcomes. *J Thromb Haemost*. 2005; 3:1603-10

24. Middeldorp S. Thrombophilia and pregnancy complications: cause or association? *J Thromb Haemost.* 2007; 5 (Suppl 1):276-82
25. Rey E, Khan SR, David M, et al. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003; 361: 901–08
26. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet* 2006; 368: 601–11
27. Jivraj S, Rai R, Underwood J, et al. Genetic thrombophilic mutations among couples with recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2006; 21 (5):1161-65
28. Raspollini MR, Oliva E, Roberts DJ. Placental histopathologic features in patients with thrombophilic mutations. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2007; 20(2):113-23
29. Mazzolai L, Duchosai MA. Hereditary Thrombophilia and venous thromboembolism: critical evaluation of the clinical implications of screening. *Eur J Endovasc Surg.* 2007; 34:483-88
30. Cooper PC, Rezende SM. An overview of method for detection of factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutations. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2007; 29: 153-162
31. Koksai V, Baris I, Etlik O. Primer-engineered multiplex PCR–RFLP for detection of MTHFR C677T, prothrombin G20210A and factor V Leiden mutations. *Exp Mol Pathol.* 2007 Aug;83(1):1-3
32. Frosst P, Blom HJ, Milos R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genets.* 1995; 10: 111–13.
33. Varela A., Bilbao M, García C, et al. Prevalencia de la mutación del factor V de la coagulación (Factor V Leiden) en donantes de banco de sangre en cuatro ciudades colombianas. *Acta Med Col* 2000; 25: 2-5.
34. Paynter RA, Hankinson SE, Hunter DJ, et al. No Association between MTHFR C677T or A1298C. Polymorphisms and Endometrial Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(6): 1088-89
35. Price DT, Ridker P. Factor V Leiden Mutation and the Risks for Thromboembolic Disease: A Clinical Perspective. *Ann Intern Med.* 1997; 127:895-903
36. Guzmán N, Jara MJ, Morales L. Variante Protrombótica C677T del Gen Metilenotetrahidrofolato Reductasa es un Biomarcador Molecular de Fallas

de Implantación en Mujeres Chilenas Sometidas a Protocolos de Reproducción Asistida. *Int. J. Morphol.* 2010; 28(1):65-69

37. Yan SB, Nelson DR. Effect of factor V Leiden polymorphism in severe sepsis and on treatment with recombinant human activated protein C. *Crit Care Med.* 2004 May;32(5 Suppl):S239-46.
38. Ridker PM, Miletich JP, Hennekens CH, et al. Ethnic distribution of Factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. *JAMA* 1997; 277: 1305-1307