

# ESTUDIO DE TROMBOFILIAS – ANÁLISIS MOLECULAR DE ALGUNOS FACTORES RELACIONADOS CON LA ALTERACIÓN EN LA HEMOSTASIA

BQ. IVONNE VERGARA P.  
LABORATORIO BIOLOGÍA MOLECULAR.  
CLÍNICA LAS CONDES.

## RESUMEN

*La enfermedad tromboembólica constituye un gran problema clínico debido a su alta incidencia y a su importante morbilidad. Desde el punto de vista patogénico, esta es una enfermedad multifactorial que resulta de la interrelación entre factores ambientales y genéticos.*

*Durante los últimos años se han identificado varios factores genéticos que predisponen a la trombosis, sin embargo sólo dos de ellos han sido ampliamente estudiados: el factor V Leiden y la protrombina 20210A.*

*Además de estos factores existen otros que quizás no se han desarrollado ampliamente como los anteriores, pero al parecer diversas investigaciones indican que la presencia de mutaciones como de la Metiltetrahidrofolato Reductasa (MTHFR) y polimorfismos del gen del Inhibidor del Activador del Plasminógeno 1 (PAI-1) y de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) pudieran participar en la alteración de la hemostasia, especialmente durante el proceso de gestación donde su efecto es más evidente.*

*Cabe destacar que nuestro laboratorio ha sido pionero en el análisis del polimorfismo para PAI-1 y ECA en conjunto con la detección de dos mutaciones para MTHFR.*

*El estudio de estas mutaciones es a través del análisis del ADN del paciente. Este examen se realiza a partir de leucocitos periféricos, siendo necesaria sólo una muestra de sangre-EDTA.*

## SUMMARY

*The thromboembolism disease constitutes a great clinical problem due to his high incident and his important morbidity. From the pathogenic point of view, this is a multifactorial disease that ensues from the interrelationship between environmental and genetic factors.*

*During the last years there have been identified several genetic factors that predispose the thrombosis, nevertheless up only two of them have been widely studied: the factor V Leiden and the prothrombin 20210A.*

*Besides these factors there exist others that probably have not widely developed as the previous ones, but apparently diverse investigations indicate that the presence of mutations as of the Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and polymorphisms of the gene of the Plasminogen-Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) and Angiotensin-converting Enzyme (ACE) should take part in the alteration of the hemostasis, specially during the process of gestation where his effect is more evident.*

*It is necessary to emphasize that our laboratory has been a pioneer in the analysis of the polymorphism for PAI-1 and ACE as a whole with the detection of two mutations for MTHFR.*

*The study of these mutations is across the analysis of the DNA of the patient. This test is realized from peripheral leukocytes for what only a sample of blood-EDTA is required.*

## INTRODUCCIÓN

Las condiciones asociadas a un mayor riesgo de trombosis venosas y/o arteriales se conocen como Trombofilias, en éste término se incluye un grupo heterogéneo de alteraciones, congénitas y adquiridas, que no deben ser consideradas como enfermedades sino como “factores de riesgo”.

Entre las Trombofilias actualmente conocidas y factibles de ser detectadas por análisis de laboratorio se encuentran:

- Mutaciones en genes específicos que originan un cambio en la actividad enzimática o en la cantidad de proteína, tales como la mutación del Factor V de Leiden, del gen 20210 A de la Protrombina, de la proteína C, la S y la Antitrombina.
- Polimorfismos como el del inhibidor del activador del Plasminógeno tipo 1 (PAI-1).
- Anticuerpos contra las proteínas de la coagulación, y otras condiciones adquiridas como: Hiperhomocisteinemia, y el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF).

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.

En el caso de pacientes con Falla Reproductiva de Origen Isquémico (FROI), es particularmente relevante descartar la presencia de una trombofilia, ya que esta condición se asocia a un incremento de 2 a 5 veces del riesgo de aborto recurrente y otras patologías del embarazo. Así mismo es recomendable descartar una Trombofilia en aquellos pacientes que tienen historia de un episodio de trombosis o tromboembolismo sin causa o evento desencadenante claramente identificado, en pacientes jóvenes con trombosis recurrentes, en pacientes con trombosis en sitios inusuales y en familiares de primer grado de pacientes con Trombofilias hereditarias.

### 1. DETECCIÓN MUTACIÓN R506Q FACTOR V LEIDEN (FV) (Código 24113)

El FV Leiden es el factor de riesgo genético más frecuentemente encontrado en las trombosis venosas. Corresponde a una mutación en el gen del factor V, que determina una resistencia a la inactivación del factor V activado (FVa) por la proteína C activada (PCa), determinando una mayor producción de trombina.

La mutación es una sustitución del nucleótido G por el nucleótido A en el nucleótido 1691. Esto determina el reemplazo en la proteína de una arginina en la posición 506 por una glutamina (1,2).

Normalmente el FVa se inactiva mediante el clivaje en la posición Arg506 seguida por un segundo clivaje en la posición Arg306. En el

caso del FV Leiden, no ocurre el clivaje en la Arg 506 determinando que el proceso de clivaje en la posición Arg306 sea diez veces más lento, lo que origina el fenómeno de la resistencia a la actividad anticoagulante de la PCa (3).

El FV Leiden se ha encontrado en alrededor del 20% de los casos con trombosis venosa profunda (TVP) y de 50% de los casos de TVP donde existe historia familiar (4-7).

Según *The Leiden Trombophilia Study*, el riesgo relativo de trombosis conferido por este factor es de 7 para los portadores heterocigotos y de 80 en los homocigotos (5).

El test más directo para la identificación del FV Leiden es el análisis genético que incluye la utilización de ADN genómico como molde para la amplificación del fragmento del gen del FV que contiene la mutación.

### 2. DETECCIÓN MUTACIÓN G20210A DEL GEN DE LA PROTROMBINA (Código 24116)

La protrombina es el precursor de la trombina, el efector final de la cascada de la coagulación que conduce a la formación de fibrina. La protrombina es una enzima clave en el equilibrio entre pro coagulación y anticoagulación porque promueve la coagulación por retroalimentación positiva y también promueve la anticoagulación mediante la activación de la vía de la proteína C. Recientemente se ha descrito una variante genética del gen de la protrombina asociada con un aumento del riesgo de trombosis. Esta mutación está localizada en la región 3'-no codificante (3'UTR) de este gen y consiste en la sustitución del nucleótido G por el nucleótido A en la posición 20210 (8). Recientes investigaciones demuestran que esta mutación produce un aumento de su función, dando como resultado final la acumulación del ARN mensajero y el incremento de la síntesis proteica de protrombina (9), anteriormente analizado por Kyrle (10) quién observó un incremento en los niveles de trombina plasmática luego de iniciada la coagulación en pacientes homocigotos y heterocigotos para esta mutación, en comparación con pacientes control. Cabe destacar además que se ha visto que altos niveles de protrombina pueden inhibir la inactivación del FVa mediada por la proteína C activada, el cual puede dar como resultado un aumento de la generación de trombina después de iniciado el proceso de coagulación (11).

Diferentes grupos han confirmado que el alelo 20210A se encuentra en un rango de 4-8% de pacientes con un primer episodio de trombosis venosa y en el 1-2% de individuos sanos (12,13). El riesgo relativo de trombosis venosa asignado a los portadores heterocigotos de la variante de protrombina es de 2-7 veces.

La detección de esta mutación sólo es posible realizarla analizando la región de este gen donde ésta se encuentra, los métodos por biología molecular son variados y en nuestro laboratorio se encuentra a disposición este análisis por PCR en tiempo real.

### 3. DETECCIÓN MUTACIONES C677T Y A1298T DE LA ENZIMA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR) (Código 24120)

La MTHFR es una enzima que cataliza la conversión del 5,10-metilen-tetrahidrofolato (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, mutilación 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 (14). Este cambio conduce a alteraciones en la función enzimática que se reflejan en una menor estabilidad de la proteína (15). 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 (16) y a una mayor incidencia de episodios trombóticos (14).

En 1998, fue descubierto un segundo polimorfismo en la MTHFR que implica la sustitución de A por C en el par de bases 1298 (17), 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 (18, 19) 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 (20).

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.

### 4. DETECCIÓN POLIMORFISMO ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA 1 (ECA-1) (Código 24420)

La Enzima Convertidora de angiotensina (ECA) existe predominantemente en las células del endotelio vascular y cataliza la conversión de Angiotensina I a Angiotensina II y la degradación de bradikina en la superficie de las células endoteliales (21). Estas reacciones y la relación que tendrían con el proceso de aterogénesis (22) han despertado gran interés por el estudio de las variaciones genéticas de la ECA. Este gen se caracteriza por presentar un polimorfismo debido a la presencia o ausencia de la secuencia repetida de 287 pares de bases dentro del intrón 16 del gen (23). La ausencia de esta secuencia o delección, se denomina "alelo D" y la presencia del mismo dentro del intrón es llamada "alelo I"

o alelo de inserción y es sabido que en los seres humanos el nivel de ECA está, al menos parcialmente, bajo control genético (24) ya que se ha observado que el alelo D está relacionado con una variación en la actividad de ECA en suero en población normal (23), de hecho, los homocigotos DD ostentan un mayor nivel de ECA circulante en comparación con los heterocigotos I/D y el homocigoto I/I (23) y muestra estar asociado con eventos patológicos relacionados con la disfunción endotelial (25-27).

Cabe destacar además que en otros estudios han relacionado el genotipo D/D con complicaciones durante el embarazo en mujeres que tenían un historial de preeclampsia y en la cual el estudio de trombofilia clásico fue descartado (28) y el genotipo D/D fue descrito como un factor predictivo de pérdida fetal (29), por lo que es importante recordar que ECA tiene una relación clave con el proceso de inflamación y la hemostasia (30) en los eventos de preeclampsia, sumado a su rol en la modulación del tono vascular y la proliferación de células musculares lisas.

### 5. DETECCIÓN POLIMORFISMO INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO (PAI-1) (Código 97165)

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 (31), el que puede encontrarse bajo tres formas moleculares: latente, activa y formando complejos con los activadores. El PAI-1 esta 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 (32).

En cuanto a su papel fisiopatológico se han observado cifras elevadas de PAI-1 en situaciones clínicas relacionadas con fenómenos trombóticos (33), mientras que varios miembros de familias con déficit de PAI-1 presentaron una moderada o severa sintomatología hemorrágica (34). El gen humano de PAI-1 se encuentra en el cromosoma 7q21.3-q22, a partir de las cuales se han descrito sus correspondientes polimorfismos (35). 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 (36), 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(37). 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.

Desde hace más de un año el Laboratorio Clínica Las Condes realiza dos paneles de estudio de trombofilia que incluyen:

**1. Panel para Estudio Básico (o tradicional):** disponible también en otros centros de referencia en el país. Este panel incluye las siguientes determinaciones:

**TABLA 1. PANEL PARA ESTUDIO BÁSICO**

- PCR Factor V ( Factor Leiden)
- Mutación G 20210 A Gen de la Protrombina
- Proteína C
- Proteína S Libre
- Anticoagulante Lúpico
- Antitrombina
- Resistencia a la Proteína C Activada

**2. Panel Trombofilia Completo:** en el cual se agrega a los exámenes del Panel Básico, otros análisis que determinan Trombofilias, algunas de ellas emergentes y con mayor frecuencia asociadas a patologías del embarazo.

Este panel completo es exclusivo de Clínica Las Condes y seguirá ampliándose con nuevas determinaciones actualmente en desarrollo.

**TABLA 2. PANEL PARA ESTUDIO COMPLETO**

- Factor VIII Coagulante
- Ac. Anticardiolipina IGG
- Ac. Anticardiolipina IGM
- PAI-1
- ADMA
- Homocisteína
- Mutación MTHFR C 677 T y A1298 C
- Ac. Anti B2 Glicoproteínas IGG
- Ac. Anti B2 Glicoproteínas IGM
- Polimorfismo ECA

Para realizar los exámenes del panel básico o completo, sólo se requiere obtener una muestra de sangre por punción venosa. El único análisis que requiere ayuno es la determinación de Homocisteína. Las instrucciones específicas para la obtención de la muestra, están disponibles en el Manual de Toma de Muestras de Laboratorio en intranet de Clínica Las Condes.

Cabe hacer presente que para estudiar a un paciente que presenta un episodio de trombosis, se recomienda realizar el estudio de Laboratorio

idealmente seis meses alejado del episodio agudo, y al menos dos semanas con posterioridad a la suspensión del tratamiento anticoagulante.

#### AGRADECIMIENTOS

Por el apoyo del Bioquímico Patricio Anabalón, Jefe de Laboratorio, Clínica Las Condes.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Greengard JS, Sun X, Xu X et al. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 1994; 343: 1361-2.
2. Voorberg J, Roelse J, Koopman R et al. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506 of factor V. *Lancet* 1994; 343: 1535-6.
3. Kalafatis M, Bertin RM, Rand MD, Mann KG. Characterization of the molecular effect in factor VR506Q. *J Biol Chem* 1995; 270: 4053-7.
4. Bertina RM, Reitsma PH, Rosendaal FR, Vandenbroucke JP. Resistance to activated protein C and factor V Leiden as risk factors for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1995; 74: 449-53.
5. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85: 1504-8.
6. Koster T, Rosendaal FR. Activated protein C resistance in venous thrombosis. *Lancet* 1994; 343: 541.
7. Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 330: 517-22.
8. 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.
9. Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G. et al. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet* 2001;28:389-392.
10. Kyrle PA, Mannhalter C, Beguin S. et al. Clinical studies and thrombin generation in patients homozygous or heterozygous for the G20210A mutation in the prothrombin gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1287-1291.
11. Smirnov MD, Safa O, Esmon NL, Esmon CT. Inhibition of activated protein C anticoagulant activity by prothrombin. *Blood* 1999;94:3839-3846.
12. U. Seligsohn, A. Lubetsky. Genetic susceptibility to venous thrombosis.

N. Engl. J. Med 44:1222.1231, 2001.

**13.** V.Vicente, R. González-Conejero, J. Rivera, J. Corral. The prothrombin gene variant 20210A in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica*. 84:356-362, 1999.

**14.** Frosst P, HJ Blom, R Milos et al. 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet*. 10:111-113.

**15.** Kang SS and PW Wong. 1996. Genetic and nongenetic factors for moderate hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis* 119:135-138.

**16.** Bagley P. J., Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 13217-13220, 1998.

**17.** Van der Put NM, F Gabreels, EM Stevens et al. 1998. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?. *Am. J. Hum. Genet*. 62:1044-1051.

**18.** Skibola CF, Smith MT, Kane E, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12810-5.

**19.** Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4004-9.

**20.** Krajcinovic M, Lamothe S, Labuda D, et al. Role of MTHFR genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103:252-7.

**21.** Ehlers RWM, Riordan JF. Angiotensin-converting enzyme: new concepts concerning its biological role. *Biochemistry* 1989;28:5311-7.

**22.** Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R et al: A prospective evaluation of an angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 332: 706-711, 1995.

**23.** Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F et al: An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86: 1343-1346, 1990.

**24.** Bauters C, Amouyel P: Association between the ACE genotype and coronary artery disease. *Eur Heart J* 19 (Suppl J): J24-J29, 1988.

**25.** Butler R, Morris AD, Burchell B, Struthers A. DD angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelial

dysfunction in normal humans. *Hypertension* 1999;33:1164-8.

**26.** Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arvelier D. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992;359:641-4.

**27.** Nakai K, Itoh C, Miura Y, et al. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation* 1994;90:2199-202.

**28.** Carp H, Dolitzky M, Inbal A. Thromboprophylaxis improves the live birth rate in women with consecutive recurrent miscarriages and hereditary thrombophilia. *J Thromb Haemost*. 2003;1:433-438.

**29.** Fatini C, Gensini F, Battagliani B et al. Angiotensin-converting enzyme DD genotype, angiotensin type 1 receptor CC genotype, and hyperhomocysteinemia increase first-trimester fetal-loss susceptibility. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2000;11:657-662.

**30.** Mellembakken JR, Aukrust P, Olafsen MK, Ueland T, Hestdal K, Videm V. Activation of leukocytes during the uteroplacental passage in preeclampsia. *Hypertension*. 2002;39:155-160.

**31.** Loskutoff DJ, Sawdey M, Mimuro J.: Type 1 plasminogen activator inhibitor. *Prog Hemost Thromb*, 1989; 9:87-115.

**32.** Colucci M, Paramo JA, Collen D.: Inhibition of one-chain and two-chain forms of human tissue-type plasminogen activator by the fast-acting inhibitor of plasminogen activator in vitro and in vivo. *J Lab Clin Med* 1986; 108 (1): 53-59.

**33.** Páramo JA, Rocha E.: Fibrinólisis y trombosis venosa. *Sangre* 1992; 37 (Supl.3):88-94.

**34.** Fay WP, Shapiro AD, Shih JL, Schleef RR, Ginsburg D.: Complete deficiency of plasminogen-activator inhibitor type 1 due to a frame shift mutation. *N Engl J Med* 1992; 327:1729-1733.

**35.** Henry M, Chomiki N, Scarabin Py et al. Five frequent polymorphisms of the PAI-1 gene: lack of association between genotypes, PAI activity, and triglyceride levels in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17: 851-858.

**36.** Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 1993; 268: 10739-10745.

**37.** Nordt TK, Lohrmann J, Bode C. Regulation of PAI-1 expression by genetic polymorphisms: impact on atherogenesis. *Thromb Res* 2001;103(suppl 1):S1-5.