

# Detección de las Mutaciones Factor V Leiden y Protrombina G20210A en Pacientes con Trombosis Venosa

Mauricio Venegas S.<sup>(1)</sup>, Guillermo Conte L.<sup>(2)</sup>, Marianela Cuneo V.<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Unidad de Biología Molecular, Laboratorio de Gastroenterología, HCUCb.

<sup>(2)</sup>Sección Hematología, HCUCb.

## RESUMEN

El tromboembolismo venoso es una condición patológica de origen multifactorial, incluyendo causas adquiridas o genéticas. De estas últimas, las mutaciones puntuales factor V Leiden y Protrombina G20210A representan las etiologías más frecuentes de trombosis hereditaria. Para el diagnóstico de estos defectos genéticos en pacientes con trombosis venosa, se realizan las técnicas de biología molecular de reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción. Desde febrero del 2001 hasta diciembre de 2005 se realizaron 565 exámenes para la detección del factor V Leiden, encontrándose un 6,19% de prevalencia (35 pacientes). Esta cifra contrasta con algunos estudios y está en concordancia con otros. En el mismo período se realizaron 557 exámenes para la detección de Protrombina G20210A, encontrándose un 6,1% de prevalencia (34 pacientes), valor que es muy similar a la mayoría de las series clínicas descritas.

## SUMMARY

Venous thromboembolism is a pathological condition of multifactorial origin, including acquired and genetic causes. The point mutations factor V Leiden and Prothrombin G20210A are the most frequent etiologies of hereditary thrombosis. To diagnose these genetic defects in patients with venous thrombosis, the molecular biological technique of polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) is used. In this study, 565 exams for the detection of factor V Leiden were carried out from February, 2001 through December, 2005, finding a prevalence of 6.19% (35 patients). This rate contradicts some studies and agrees with others. In the same period, 557 exams for the detection of prothrombin G20210A were performed, finding a prevalence of 6.1% (34 patients), a very similar value to the prevalence reported in the majority of the published clinical series.

Recibido 25/04/2006 | Aceptado 31/05/2006

## INTRODUCCIÓN

Actualmente se conocen varios factores hereditarios que predisponen a la trombosis venosa, de los cuales las mutaciones puntuales factor V Leiden (FVL, G1691A) y Protrombina G20210A

(PT G20210A) son los factores genéticos de mayor prevalencia<sup>(1,2,3)</sup>.

El FVL corresponde a una mutación puntual consistente en una sustitución de una adenina por una guanina en la posición 1691 del gen que

codifica para esta proteína, lo que determina un cambio del aminoácido arginina por glutamina en la posición 506, lo que a su vez provoca una pérdida de uno de los tres sitios de corte que realiza la proteína C activada, como anticoagulante natural que regula la actividad procoagulante del factor Va y factor VIIIa<sup>(4)</sup>.

Este polimorfismo es el responsable del 95 % de los casos de resistencia a la proteína C activada<sup>(4)</sup> y se ha descrito que la portación con carácter heterocigoto confiere un aumento en el riesgo de un primer episodio de trombosis que oscila entre 3,5 a 8 veces<sup>(5)</sup>. La condición de homocigocidad para el defecto genético confiere un aumento de 80 veces el riesgo de trombosis venosa<sup>(2)</sup>.

Por otro lado, la mutación PT G20210A también es una mutación puntual correspondiente a una sustitución de una adenina por una guanina, la que ocurre en la región 3' no codificante del gen que codifica para la protrombina, por lo cual no se ve afectada la secuencia aminoacídica de la proteína. El mecanismo por el cual este polimorfismo conlleva a un aumento en el riesgo de trombosis no está definido, sin embargo se ha observado que los portadores de esta mutación poseen niveles plasmáticos de protrombina más elevados, lo que aumenta su riesgo de trombosis venosa en 2,8 veces, respecto a los portadores del alelo normal<sup>(3)</sup>.

El objetivo del presente trabajo es dar a conocer las prevalencias de los polimorfismos factor V Leiden y PT G20210A de los pacientes con antecedentes de trombosis venosa que son atendidos o derivados al Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

## MATERIAL Y MÉTODO

Desde febrero de 2001 a diciembre de 2005, se recibieron en la Unidad de Biología Molecular del Laboratorio de Gastroenterología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, 661 muestras de sangre para estudio de los factores

genéticos asociados a trombosis en 401 mujeres y 260 hombres. El promedio de edad de los pacientes fue de 43 años con un rango entre 1 mes hasta 83 años. De estas muestras, 471 fueron dirigidas al estudio conjunto de FVL y PT G20210A, 94 sólo para el estudio de FVL y 86 sólo para PT G20210A. Esto nos da un total de 565 exámenes para el primer polimorfismo y de 557 para el segundo. Los diagnósticos más comunes para la solicitud de los estudios genéticos fueron la trombosis venosa profunda, accidente vascular encefálico y tromboembolismo pulmonar, la mayoría referidos por un primer evento trombótico y con sospecha clínica de trombofilia.

Las muestras de sangre fueron recibidas en tubos con EDTA o citrato de sodio como anticoagulante y congeladas a -20 °C hasta su procesamiento, el cual fue realizado en un período no superior a los 15 días después de recibida la muestra.

Es importante destacar que el tratamiento anticoagulante no afecta la realización de los estudios moleculares para la detección de estos factores genéticos.

Para la detección de los polimorfismos mencionados se trabajó con DNA genómico el cual fue obtenido mediante el uso del kit comercial *Wizard® Genomic DNA purification* (Promega), adaptado para trabajar con un volumen de 150 µL de sangre.

Posteriormente se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cuyas condiciones de concentración de reactivos y de temperaturas de trabajo fueron optimizadas en nuestro laboratorio para que fueran idénticas para los 2 genes a amplificar. Los partidores utilizados para la amplificación del segmento del gen del factor V fueron: Sentido 5' - CAT GAG AGA CAT CGC CTC TG - 3' y antisentido 5' - CTT GAA GGA AAT GCC CCA TTA - 3'<sup>(6,7)</sup>. Con estos partidores se espera obtener un amplificado de 178 pares de bases.

Para la amplificación de un segmento de 345 pares de bases del gen de la protrombina los partidores utilizados fueron: Sentido 5' - TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC - 3' y antisentido 5' - ATA GCA CTG GGA GCA TTG AA\*G C - 3'<sup>(3)</sup>. El partidador antisentido que se utiliza lleva una sustitución nucleotídica cercana al extremo 3' (denotado con \*), la cual, al combinarse con la mutación PT G20210A, genera un sitio de reconocimiento para ser cortado con una enzima de restricción.

Para un volumen de reacción de 30  $\mu$ L, las concentraciones finales de los reactivos fueron las siguientes: Tris-HCl 10 mM (pH 9), KCl 50 mM, Triton® X-100 0,1 %,  $MgCl_2$  1,5 mM, dNTP's 0,2 mM, partidores 0,5  $\mu$ M y 1 unidad de Taq DNA polimerasa. Se utilizaron 10  $\mu$ L de DNA genómico aislado.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en el Termociclador PTC-100 (MJ Research) programado con 40 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 55 °C por 40 segundos y 72 °C por 1 minuto, con una extensión final de 10 minutos a 72 °C. La detección de los productos amplificados se realizó en gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio, visualizado con luz ultravioleta, y del cual se tomó registro fotográfico.

Para la identificación de las mutaciones, se realizó la técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Para ello, se utilizaron 20  $\mu$ L de producto amplificado, los cuales fueron digeridos durante 2 horas a 37 °C con 5 unidades de la enzima de restricción *Mnl I* (New England Biolabs) para el amplificado del factor V y con 20 unidades de la enzima *Hind III* (New England Biolabs) para el amplificado de protrombina. Los productos de la digestión enzimática fueron corridos en un gel de agarosa al 3 % y teñido con bromuro de etidio para su visualización.

La enzima *Mnl I* reconoce 2 sitios de corte en el gen del factor V normal, generando fragmentos de 116, 37 y 25 pares de bases. La mutación FVL

(G1691A) elimina un sitio de corte, lo que origina solo 2 fragmentos, de 153 y 25 pares de bases, en el caso de pacientes homocigotos. Si el paciente es heterocigoto, el patrón de bandas obtenido es de 4 fragmentos, 153, 116, 37 y 25 pares de bases.

La enzima *Hind III* no reconoce sitios de corte en el gen de la protrombina normal, quedando el amplificado intacto. La mutación PT G2010A, en combinación con la mutación incorporada en el proceso de PCR, genera un sitio de corte, lo que origina 2 fragmentos, de 322 y 23 pares de bases, en el caso de pacientes homocigotos. Si el paciente es heterocigoto, el patrón de bandas obtenido es de 3 fragmentos, 345, 322 y 23 pares de bases.

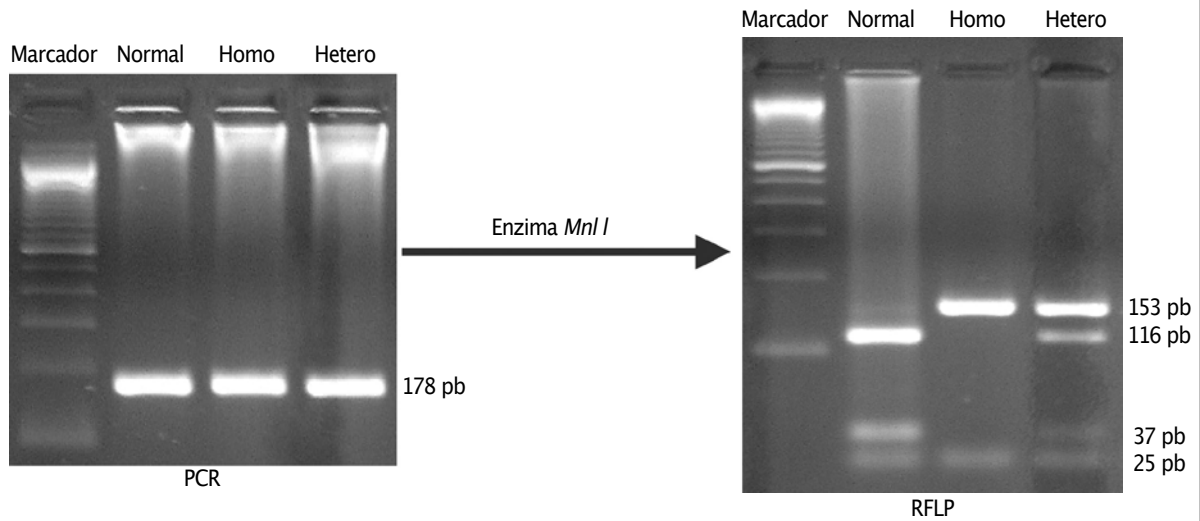
## RESULTADOS

De los 565 exámenes para la detección del FVL, 35 (6,19%) resultaron ser positivos (20 mujeres y 15 hombres), 31 con carácter heterocigoto (5,49 %, 19 mujeres y 12 hombres) y 4 homocigotos (0,71%, 1 mujer y 3 hombres). Con respecto a la detección del polimorfismo PT G20210A, 34 de los 557 pacientes estudiados (6,1%, 16 mujeres y 18 hombres) resultaron ser portadores de la mutación, 33 con carácter heterocigoto (5,92%, 15 mujeres y 18 hombres) y sólo 1 homocigoto (0,18%, mujer). De los 471 pacientes a quienes se les estudió ambas mutaciones, ninguno presentaba polimorfismo para ambos genes.

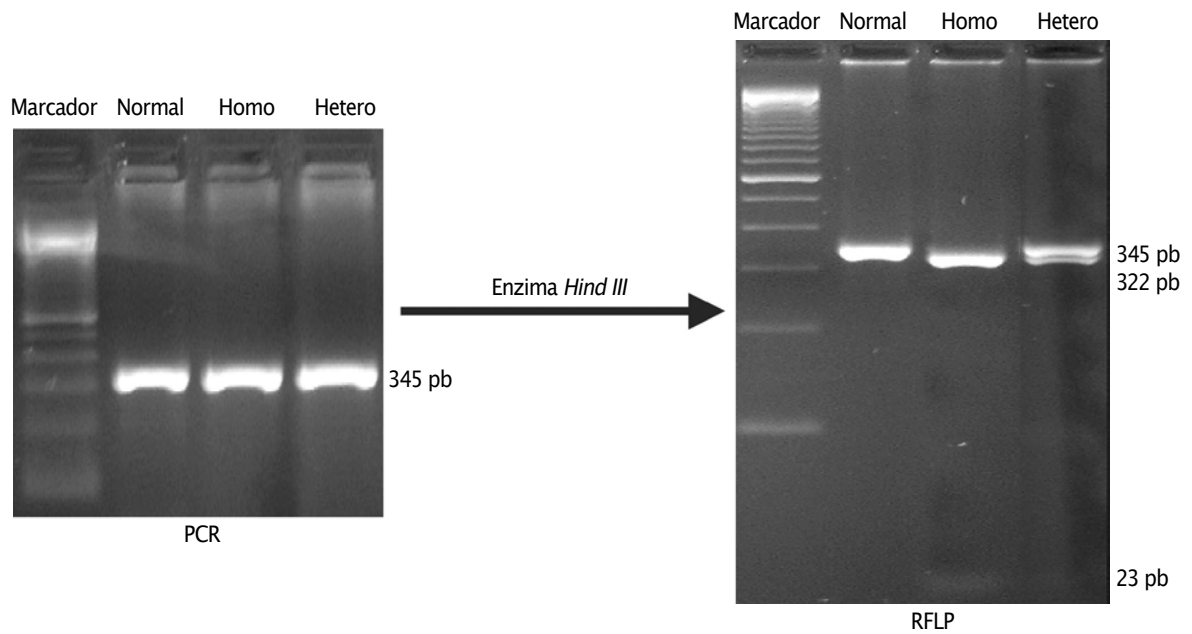
En la figura 1 se muestran las fotografías de los procedimientos del PCR y RFLP correspondientes a la detección del polimorfismo FVL. Del mismo modo, en la figura 2 se muestran las fotografías de los procedimientos del PCR y RFLP correspondientes a la detección del polimorfismo PT G20210A.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio, mediante las técnicas de PCR y RFLP, se describe la existencia de los



**Fig. 1** A la izquierda se muestra el producto de PCR que se obtiene al amplificar un segmento del gen del factor V cargado en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. En la fotografía el primer carril corresponde al marcador de peso molecular de 100 pares de bases. En los carriles siguientes se cargaron las muestras de pacientes. A la derecha se observa el resultado del RFLP al usar la enzima *Mnl I*. El producto de la digestión con esta enzima fue cargado en un gel de agarosa al 3%. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular de 100 pares de bases y en los carriles siguientes se cargaron las muestras de un paciente normal, un portador homocigoto (homo) y un portador heterocigoto (hetero), respectivamente. pb= pares de bases.



**Fig. 2** A la izquierda se muestra el producto de PCR que se obtiene al amplificar un segmento de la región 3' no codificante del gen de la protrombina y cargado en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. En la fotografía, el primer carril corresponde al marcador de peso molecular de 100 pares de bases. En los carriles siguientes se cargaron las muestras de pacientes. A la derecha se muestra el resultado del RFLP al usar la enzima *Hind III*, en que el producto de la digestión fue cargado en un gel de agarosa al 3%. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular de 100 pares de bases y en los carriles siguientes se cargaron las muestras de un paciente normal, un portador homocigoto (homo) y un portador heterocigoto (hetero), respectivamente. pb = pares de bases.

polimorfismos FVL y PT G20210A en pacientes con antecedentes de trombosis venosa, con sospecha clínica de trombofilia y que son atendidos o derivados al Hospital Clínico de la Universidad de Chile, para el diagnóstico molecular. El tratamiento anticoagulante que se inicia al momento del diagnóstico no permite realizar el estudio de coagulación convencional. Por otro lado, la prevalencia de estos defectos genéticos reportadas en la literatura y el hecho de que los episodios trombóticos se pueden manifestar a cualquier edad, determinan la búsqueda de estas mutaciones. La prevalencia que encontramos para la mutación PT G20210A es muy similar a la descrita en la literatura (6%)<sup>(8-10)</sup>, mientras que el FVL es significativamente menor que lo descrito en algunas series clínicas (6% versus 11,5 – 37%)<sup>(2,5,10-13)</sup>. Sin embargo, la mayoría de estos trabajos fueron realizados en población europea de origen caucásico, en que el polimorfismo FVL es mucho más frecuente que en otras razas. Al respecto se ha postulado que la mutación FVL habría aparecido en Europa y desde allí se habría dispersado por migración al resto del mundo. Esto se refuerza más aún con el hecho que sólo en la población general de origen europeo (sin antecedentes de trombosis), la prevalencia de este polimorfismo es de 4,4%, más alta comparada a poblaciones asiáticas, africanas y nativos americanos, con prevalencias del 0 – 1%<sup>(14)</sup>.

Además de lo anterior, estos resultados también contrastan con la alta prevalencia de FVL descrito en 105 pacientes chilenos con trombofilia primaria, en que se encuentra un 18,3% de FVL(15). Esta diferencia puede estar dada por las características de los pacientes estudiados, ya que en ese estudio se consideraron pacientes con trombofilia primaria (hereditaria) y con trombosis recurrente (2 ó más episodios), siendo ambos antecedentes asociados a una mayor prevalencia de este defecto genético<sup>(1,16)</sup>.

En cambio, nuestro estudio muestra una clara similitud con los datos de un trabajo realizado en la ciudad de Temuco, en que se analizaron los 2 polimorfismos en 164 pacientes con sospecha de trombofilia, obteniéndose prevalencias de 4,8 y 3% para el FVL y PT G20210A respectivamente<sup>(17)</sup>.

Finalmente, en una publicación más reciente se han descrito las prevalencias de las mutaciones FVL y PT G20210A en pacientes chilenos de la ciudad de Talca con trombosis venosa profunda y trombosis arterial, encontrándose los porcentajes de 5,4% para ambos polimorfismos, valores muy cercanos a los descritos en el presente trabajo<sup>(18)</sup>.

## REFERENCIAS

1. Bertina RM, Koeleman RPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, De Ronde H, Van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-7.
2. 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.
3. 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.

4. Zoller B, García de Frutos P, Hillarp A, DahlBäck B. Thrombophilia as a multigenic disease. *Haematologica* 1999; 84: 59-70.
5. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995; 332: 912-7.
6. Beauchamp NJ, Daly ME, Hampton KK, Cooper PC, Preston FE, Peake IR. High prevalence of a mutation in the factor V gene within the U. K. population: relationship to activated protein C resistance and familial thrombosis. *Brit J Haemat* 1994; 88: 219-22.
7. Gómez E, Van der Poel SC, Jansen JH, Van der Reijden DA, Lowenberg B. Rapid simultaneous screening of factor V Leiden and G20210A prothrombin variant by multiplex polymerase chain reaction on whole blood. *Blood* 1998; 91: 2208-9.
8. Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation* 1999; 99: 999-1004.
9. Vicente V, González-Conejero R, Rivera J, Corral J. The prothrombin gene variant 20210A in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica* 1999; 84: 356-62.
10. Francès F, Portolès O, Gabriel F, Corella D, Sorli JV, Sabater A, Alfonso JL, Guillen M. Comparación de las frecuencias de los alelos factor V Leiden (G1691A) y protrombina-G20210A entre pacientes con trombosis venosa profunda y población general mediterránea española. *Rev Méd Chile* 2006; 134: 13-20.
11. 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.
12. Dahlback B. Resistance to activated protein C caused by the factor V R506Q mutation is a common risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78: 433-8.
13. De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Leone G. Epidemiology of factor V Leiden: clinical implications. *Semin Thromb Hemostas* 1998; 24: 367-79.
14. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346: 1133-4.
15. Srur E, Vargas C, Salas S, Parra JA, Bianchi V, Mezzano D, Muñoz B, Vásquez M, Pacheco E. Trombofilia primaria: detección y manifestación clínica en 105 casos. *Rev Méd Chile* 2004; 132: 1466-73.
16. Simioni P, Randoni P, Lensing AW, Scudeller A, Sardella C, Prins MH, Villalta S, Dais F, Girolami A. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with an Arg 506 → Gln mutation in the gene for factor V (factor V Leiden). *N Engl J Med* 1997; 336: 399-403.

17. Treulen F, Diaz T, Hinostroza J. Prevalencia de factores genéticos (factor V Leiden y mutación II20210 de la protrombina) en pacientes con sospecha de trombofilia. Abstract P4 Pag. 60. XIV Congreso Chileno de Química Clínica. Octubre 2005.
18. Palomo I, Pereira J, Alarcón M, Pinochet C, Vélez MT, Sandoval J, Icaza G, Pierangeli S. Factor V Leiden y mutación de la protrombina G20210A en pacientes con trombosis venosa y arterial. Rev Méd Chile 2005; 133: 1425-33.

#### **CONTACTO**

Dr. Mauricio Venegas Santos  
Sección de Gastroenterología  
Hospital Clínico Universidad de Chile  
Santos Dumont 999 3° D. Of. D316, Independencia, Santiago  
Email: [mvenegas@redclinicauchile.cl](mailto:mvenegas@redclinicauchile.cl)

