

## ARTÍCULO

## Frecuencia de la mutación del factor V Leiden y protrombina G20210A en pacientes con tromboembolismo venoso.



Trina López<sup>1</sup>, Víctor Delgado<sup>1</sup>, Dulce Puentes<sup>2</sup>, Wolfan Araque<sup>1</sup>, Alida Rosales<sup>2</sup>, Alicia Granadillo<sup>3</sup>, María Rojas<sup>3</sup>, Judith Bimánis<sup>2</sup>.

## RESUMEN

El factor V Leiden y protrombina G20210A son factores de riesgo clínico de trombosis venosa. El objetivo de este estudio fue comparar la frecuencia simple o combinada de mutaciones en el factor V (Leiden) y protrombina (G20210A) en 140 sujetos de la ciudad de Valencia-Venezuela. El primer grupo pacientes (G-I) consistió en 45 referidos por un centro cardiológico con historia de hipertensión e isquemia miocárdica, el segundo grupo paciente (G-II) fueron 44 con historia de trombosis venosa y el grupo control (G-III) 51 personas saludables. Las muestras de sangre fueron analizadas mediante reacciones específicas en cadena de la polimerasa y digestión con enzimas de restricción. La prevalencia de factor V Leiden en G-I fue 6,6%, 2,2% homocigotas ( $p = 0,6627$ ), y 6,7% heterocigotas para protrombina G20210A ( $p = 0,0993$ ), mientras que en G-II, 18,2% fueron portadores del factor V Leiden ( $p = 0,0407$ ) y 2,3% para protrombina G20210A, todos heterocigotas ( $p = 0,4632$ ). No fueron detectados portadores de mutación de la protrombina G20210A en G-III, pero 3,9% fue heterocigota para el factor V Leiden. Los resultados muestran que el factor V Leiden es más frecuente en los pacientes con historia de trombosis venosa, sugestivo de potencial factor de riesgo, y que no parece existir asociación entre la mutación de la protrombina G20210A con las condiciones clínicas evaluadas.

**Palabras clave:** Trombosis, factor V Leiden, protrombina G20210A.

## ABSTRACT

### Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in adults with a history of venous thromboembolism

Factor V Leiden and prothrombin G20210A are clinical risk factors for venous thrombosis. The aim of this study was to compare the frequency of single and combined factor V (Leiden) and prothrombin G20210A mutation in 140 subjects from Valencia City, Venezuela. The first group (G-I) consisted of 45 patients referred by a cardiology center, with a history of hypertension and myocardial ischemia; the second group (G-II) were 44 patients with a history of venous thrombosis, and the control group (G-III), 51 healthy individuals. Blood samples were analyzed by specific polymerase chain reactions and restriction enzymes. The prevalence of the factor V Leiden in G-I patients was 6.6%, 2.2% homocytotes ( $p = 0.6627$ ), and 6.7% heterocytotes for prothrombin G20210A ( $p=0.0993$ ); while in G-II, 18.2% carried the factor V Leiden ( $p=0.0407$ ) and 2.3% the prothrombin G20210A all heterocytotes ( $p = 0.4632$ ). No carrier for prothrombin G20210A mutation was found in G-III, and 3.9% was heterocytous for the V Leiden factor. Results show that the factor V Leiden is more frequent in patients with a history of venous thromboembolism, suggesting a potential risk factor; no association was found between the prothrombin G20210A mutation and the clinical conditions evaluated.

**Key words:** thrombosis, factor V Leiden, prothrombin G20210A.

## INTRODUCCIÓN

El tromboembolismo venoso (TEV) es un trastorno frecuente en la sociedad occidental, con una incidencia anual de un caso / 1.000 habitantes, originada por causas congénitas y/o adquiridas que confluyen en un momento concreto en el paciente. Normalmente existe una causa desencadenante, no siempre evidente, que combinada con otros factores, aumentan el riesgo de TEV. Mutaciones en el factor V (Leiden) y la protrombina (G20210A) son asociados con riesgo de trombosis venosa (1-3).

La variación en el gen del factor V de la coagulación consiste en una mutación puntual, donde la guanina en posición 1691 es sustituida por una adenina, generando el cambio en un aminoácido de la secuencia del factor V (Arg 506-Gln), que se presenta en 5% de la población; este factor es esencial para acelerar la coagulación, al actuar como cofactor del factor Xa en la activación de la protrombina (4). La proteína C activada (APC) regu-

<sup>1</sup> Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas (LabDEI), FCS, UC. Pabellón 3, Escuela de Bioanálisis, Barbula, Naguanagua, Edo Carabobo, Venezuela

<sup>2</sup> FundaCardio. Residencias Pechinnenda, Calle 113, Camoruco, Valencia, Venezuela.

<sup>3</sup> Instituto de Oncología Dr. Miguel Pérez Carreño, Barbula, Naguanagua, Venezuela.

**Correspondencia:**

**E-mail:** [delgadov@uc.edu.ve](mailto:delgadov@uc.edu.ve)

**Financiamiento:** Fonacit 200001901; CDCH 99014; Ayuda Menor 00150-07

**Correspondencia:** V. Delgado.

**E-mail:** [delgadov@uc.edu.ve](mailto:delgadov@uc.edu.ve)

**Recibido:** Abril 2007 **Aceptado:** Junio 2007

la la coagulación inactivando los cofactores Va y VIIIa; esta proteína inactiva al factor Va cortando los enlaces Arg306, Arg506 y Arg679, controlando de esta forma la velocidad y extensión de la coagulación (5). El corte en Arg506 acelera el corte en las otras dos argininas, por esta razón cuando la Arg506 está sustituida por el ácido glutámico, como ocurre en la mutación del factor V, la APC no puede cortar este enlace, y la velocidad de rotura de las otras dos argininas se reduce, por lo que la inactivación del factor V es mucho más lenta y no puede regularse la coagulación en este punto; existiendo por tanto, mayor tendencia a la trombosis en portadores de la mutación, aumentando el riesgo de TEV hasta 7 veces en portadores heterocigotas y 80 veces en homocigotos (6,7).

El gen que codifica para la protrombina se localiza en el cromosoma 11, la mutación involucra el cambio de guanina por adenina en la posición 20210 (G20210A), que propicia niveles aumentados de protrombina circulante y actividad procoagulante (1). Esta mutación es menos frecuente que la del factor V y ha sido asociada con trombosis venosa o arterial, isquemia cerebrovascular e infarto miocárdico (8-10).

En latinoamérica la prevalencia de la mutación del factor V (Leiden) es: 5,1% Argentina, 2% Costa Rica y 1,6% en Venezuela (11) y la protrombina G20210A 1-2% en Uruguay 0,95% en Chile (12,13), sin embargo existen pocos estudios que reflejen la actual prevalencia de estas mutaciones en América Latina, así como el impacto de las mismas en el TEV. Este estudio compara la frecuencia de estas mutaciones en individuos sanos de Valencia-Venezuela y pacientes: de una consulta cardiológica y con antecedentes de tromboembolismo venoso.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Siguiendo los principios éticos y de consentimiento de los pacientes, se seleccionaron 140 adultos no relacionados, 45 pacientes (16 masculinos, 29 femeninos) entre 17 y 72 años (promedio 49 años) de una consulta de cardiología (FundaCardio-Valencia) integraron el grupo G-I, el grupo G-II lo conformaron 44 pacientes (14 masculinos, 30 femeninos) edad comprendida entre 11 y 80 años (promedio 44 años) con antecedentes de tromboembolismo venoso (trombosis venosa y/o embolismo pulmonar) referidos al Banco de Sangre del Instituto de Oncología Dr. Miguel Pérez Carreño y el grupo control (G-III) lo formaron 51 individuos aparentemente sanos (16 masculinos, 35 femeninos) entre 17 y 36 años (promedio 20 años).

El criterio diagnóstico empleado: hipertensión arterial, cifras tensionales y mapa de presión. Isquemia miocárdica y

cerebral, electrocardiograma, ecocardiograma, prueba de esfuerzo, tomografía axial de cráneo (TAC) y resonancia magnética de cráneo (RMN); y de TEV sintomatología, ultrasonido Doppler, gammagrama de ventilación-perfusión y dímero D. Se excluyeron los pacientes con diabetes, pérdida fetal recurrente, preeclampsia y/o cáncer.

El estudio genético consistió en la extracción de ADN de muestras de sangre periférica en EDTA mediante un protocolo comercial (Wizard, Promega) y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El genotipo del factor V Leiden y la protrombina G20210A se determinó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y longitud de fragmentos de restricción polimórficos (RFLP) previamente descritos (14,15).

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante la prueba exacta de Fischer con un nivel de significancia de 0,05; se agruparon los portadores homocigotos y heterocigotos para el factor V Leiden o protrombina G20210A para comparar las frecuencias de ambas mutaciones en la población seleccionada, utilizando el software Statistix.

## RESULTADOS

Los antecedentes clínicos predominantes en el G-I fueron: Hipertensión 26,7%, isquemia cerebral 17,8% e isquemia miocárdica 4,9%. La tabla I, muestra los resultados de detección molecular de portadores de los factores V Leiden y protrombina G20210A destacándose 3 de 45 (6,7%) pacientes del G-I fueron portadores del factor V Leiden ( $p=0,6627$ ), todos del sexo femenino (1 homocigoto, 2 heterocigoto). En el G-II las manifestaciones clínicas principales fueron: trombosis venosa 66%, trombosis venosa combinada con embolismo pulmonar 10,6% y trombosis en sitios inusuales 8,5%. Siendo 8 de 44 (18,2%) portadores del factor V Leiden, 5 femeninos y 3 masculinos, todos heterocigotos, mientras que en G-III se detectó en 2 de 51 (3,9%), ambos heterocigotos. El análisis estadístico muestra diferencia significativa en la frecuencia del factor V Leiden en el G-II ( $p=0,0407$ ). La protrombina G20210A en los pacientes del G-I se evidenció en 3 de 45 (6,7%), siendo todos heterocigotos femeninos y en los pacientes del G-II 1 de 44 (2,3%) fue portador heterocigoto (femenino) de esta mutación, mientras que en G-III no se detectó. El análisis estadístico no muestra diferencias significativas en la protrombina G20210A entre los grupos estudiados, G-I ( $p = 0,0993$ ) y G-II ( $p = 0,4632$ ).

**Tabla I.** Frecuencia de la mutación del factor V Leiden y protrombina G20210A en pacientes seleccionados y controles saludables

Genotipo	Grupo (%)		
	G-I	G-II	G-III
	n=45	n=44	n=51
<b>Factor V Leiden</b>			
Normal (G/G)	42 (93,3)	36 (81,8)	49 (96,1)
Heterocigota (G/A)	2 (4,4)	8 (18,2)	2 (3,9)
Homocigota (A/A)	1 (2,2)	0	0
Total	3 (6,6)	8 (18,2)	2 (3,9)
p	0,6627	0,0407	
<b>Protrombina G20210A</b>			
Normal (G/G)	42 (93,3)	43 (97,7)	51 (100)
Heterocigota (G/A)	3 (6,7)	1 (2,3)	0
Homocigota (A/A)	0	0	0
Total	3 (6,7)	1 (2,3)	0
p	0,0993	0,4632	

**G-I:** Pacientes con hipertensión e isquemia miocárdica o cerebral.

**G-II:** Pacientes con tromboembolismo venoso.

**G-III:** Controles sanos.

**p** = significancia (prueba exacta de Fischer).

## DISCUSIÓN

El factor V Leiden y protrombina G20210A son mutaciones genéticas implicadas en la coagulación de la sangre, que predisponen a los portadores homocigotos o heterocigotos al desarrollo de trombosis. El presente estudio sobre la frecuencia del factor V Leiden y protrombina G20210A en grupos de pacientes de una consulta cardiológica (G-I), y pacientes con antecedentes de tromboembolismo venoso (G-II) muestra la presencia de protrombina G20210A en la población estudiada (6,7 y 2,3% respectivamente). Estas frecuencias se ubican dentro de los niveles registrados en varias regiones del mundo, siendo similares a las reportadas en pacientes con antecedentes de trombosis venosa o infarto al miocardio (16), trombosis venosa cerebral (17) e isquemia cerebral (18-20); e inferiores a la encontrada en pacientes con historia familiar de tromboembolismo venoso (21) trombosis venosa profunda sola o combinada con embolismo pulmonar (22,23). La mutación G20210A ha sido calificada como factor de riesgo de trombosis venosa en niños y adolescentes (24), en asociación con embolismo pulmonar (22); pero no parece tener significancia como factor de riesgo en el infarto al miocardio (16,25); aunque esto es aún incierto (26). En este estudio

no se detectaron portadores de la mutación en los controles aspecto saludable, en contraste con los índices señalados en población sana (16,21,23,25).

El factor V Leiden se encontró en los grupos G-I, G-II y G-III (4,8; 18,2 y 3,9%, respectivamente), sin diferencias significativas entre G-I y G-III ( $p=0,6627$ ), pero estadísticamente significativas para el G-II ( $p = 0,0407$ ). Las frecuencias en todos los grupos estudiados fueron mayores a la reportada (1,6%) en un trabajo previo realizado en Valencia en donantes voluntarios (11), pero similares a la referida en pacientes con antecedentes de infarto al miocardio (25) e isquemia cerebral (19,20,27), y menores a la reportada en trombosis venosa profunda (24,22). La frecuencia de mutaciones homocigota (2,2%) y heterocigota en los pacientes G-I y G-II (4,4 - 18,2% respectivamente) son menores a la observada en pacientes con trombosis venosa profunda o embolismo pulmonar: 8,6% homocigota y 31,5% heterocigota (21). La protrombina G20210A y factor V Leiden son factores genéticos de riesgo que exponen a los portadores a eventos y complicaciones tromboembólicas venosas (28).

La frecuencia de mutaciones encontradas es importante desde el punto de vista epidemiológico-preventivo, donde el factor V Leiden constituye un potencial marcador genético de riesgo de las enfermedades trombóticas (24,22), aunque es recomendable estudios con mayor cantidad de pacientes, para esclarecer la correlación con otros factores no genéticos (tabaquismo, obesidad, aborto).

## BIBLIOGRAFÍA

- 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; 88:3698-3703.
- Herrington DM, Vittinghoff E, Howard TD, Major DA, Owen J, Reboussin DM, Bowden D, Bittner V, Simon JA, Grady D, Hulley SB. Factor V Leiden, hormone replacement therapy, and risk of venous thromboembolic events in women with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1012-1017.
- Kamphuisen PW, Rosendaal FR, Eikenboom JCJ, Bos R, Bertina RM. Factor V antigen levels and venous thrombosis: risk profile, interaction with factor V Leiden, and relation with factor VIII antigen levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1382-1386.
- Ridker PM, Hennekens CH, Lindpainter K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Eng J Med* 1995; 332:912-917.
- Bertina RM, Koeleman BPC, 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: 64-67.
- Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353:1167-1173.
- Folsom AR, Cushman M, Tsai MY, Aleksic N, Heckbert SR, Boland LL, Tsai AW, Yanez ND, Rosamond WD. A prospective study of venous thromboembolism in relation to factor V Leiden and related factors. *Blood* 2002; 99:2720-2725.

8. De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Casorelli I, Rossi E, Molinari M, Servidei S, Tonali PA, Leone G. Prothrombin G20210A mutant genotype is a risk factor for cerebrovascular ischemic disease in young patients. *Blood* 1998; 91:3562-3566.
9. Longstreth WT, Rosendaal FR, Siscovick DS, Vos HL, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Koepsell TD, Reitsma PH. Risk of stroke in young women and two prothrombotic mutations: factor V Leiden and prothrombin gene variant (G20210A). *Stroke* 1998; 29:577-580.
10. Butt C, Zheng H, Randell E, Robb D, Parfrey P, Xie Y. Combined carrier status of prothrombin 20210A and factor XIII-A Leu34 alleles as a strong risk factor for myocardial infarction: evidence of a gene-gene interaction. *Blood* 2003; 101:3037-3041.
11. Herrmann FH, Koesling M, Schroder W, Altman R, Jimenez Bonilla R, Lopaciuk S, Perez-Requejo JL, Singh JR. Prevalence of factor V Leiden mutation in various populations. *Genet Epidemiol* 1997; 14:403-411.
12. Lens D, Otero AM, Cotic G, Henry S, Díaz A, Attarian D, Agorio C, Pierri S. Diagnóstico molecular de factores protrombóticos: primeros casos de factor V Leiden y protrombina 20210A en Uruguay. *Rev Med Uruguay* 2000; 16:39-44.
13. Mezzano D. Hipercoagulabilidad: Estudio y tratamiento. *Boletín de la Escuela de Medicina Universidad Católica de Chile*. 1998; 27:161-165.
14. Beauchamp NJ, Daley ME, Cooper PC, Preston FE, Peake IR. Rapid two-stage PCR for detecting factor V G1691.A mutation. *The Lancet* 1994; 344:694-695.
15. Danneberg J, Abbas AP, Bruggeman BJM, Engel H, Gerrits J, Martens A. Reliable genotyping of the G-20210A mutation of coagulation factor II (prothrombin). *Clin Chem* 1998; 44:349-351.
16. 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.
17. Biousse V, Conard J, Brouzes C, Horellou MH, Ameri A, Bousser MG. Frequency of the 20210 G-A mutation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene in 35 cases of cerebral venous thrombosis. *Stroke* 1998; 29:1398-1400.
18. Lichy C, Reuner KH, Buggle F, Litfin F, Rickmann H, Kunze A, Brandt T, Grau A. Prothrombin G20210A mutation, but not factor V Leiden, is a risk factor in patients with persistent foramen ovale and otherwise unexplained cerebral ischemia. *Cerebrovascular Diseases* 2003; 16:83-87.
19. Madonna P., de Stefano V., Coppola A., Cirillo F., Cerbone A., Orefice G., Di Minno G. Hyperhomocysteinemia and other inherited prothrombotic conditions in young adults with a history of ischemic stroke. *Stroke* 2002; 33:51-56.
20. Pezzini A., Del Zotto E., Magoni M., Costa A., Archetti S., Grassi M., Akkawi N.M., Albertini A., Assanelli D., Vignolo L.A., Padovani A. Inherited thrombophilic disorders in young adults with ischemic stroke and patent foramen ovale. *Stroke* 2003; 34:28-33.
21. Salomon O, Steinberg DM, Zivelin A, Gitel S, Dardik R, Rosenberg N, Berliner S, Inbal A, Many A, Lubetsky A, Varon D, Martinowitz U, Seligsohn U. Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism prevalence and risk assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19:511-518.
22. Margaglione M, Brancaccio V, De Lucia D, Martinelli I, Ciampa A, Grandone E, Di Minno G. Inherited thrombophilic risk factors and venous thromboembolism: distinct role in peripheral deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Chest* 2000; 118:1405-1411.
23. Reuner KH, Ruf A, Litfin F, Patscheke H. The mutation G20210→A in the prothrombin gene is a strong risk factor for pulmonary embolism. *Clin Chem* 1998; 44:1365-1366.
24. Junker R, Koch HG, Auberger K, Münchow N, Ehrenforth S, Nowak-Göttl U. Prothrombin G20210A gene mutation and further prothrombotic risk factors in childhood thrombophilia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2568-2572.
25. Redondo M, Watzke HH, Stucki B, Sulzer I, Demarmels Biasiutti F, Binder BR, Furlan M, Lämmle B, Wuillemin WA. Coagulation factors II, V, VII, and X, prothrombin gene 20210G→A transition, and factor V Leiden in coronary artery disease: high factor V clotting activity is an independent risk factor for myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1020-1025.
26. Burzotta F, Paciaroni K, De Stefano V, Chiusolo P, Manzoli A, Casorelli I, Leone AM, Rossi E, Leone G, Maseri A, Andreotti F. Increased prevalence of the G20210A prothrombin gene variant in acute coronary syndromes without **metabolic or acquired risk factors** or with limited **extent of disease**. *European Heart Journal* 2002; 23: 26–30.
27. Kenet G, Sadetzki S, Murad H, Martinowitz U, Rosenberg N, Gitel S, Rechavi G, Inbal A. Factor V Leiden and antiphospholipid antibodies are significant risk factors for ischemic stroke in children. *Stroke* 2000; 31:1283-1288.
28. Simioni P, Prandoni P, Lensing AWA, Manfrin D, Tormene D, Gavasso S, Girolami B, Sardella C, Prins M, Girolami A. Risk for subsequent venous thromboembolic complications in carriers of the prothrombin or the factor V gene mutation with a first episode of deep-vein thrombosis. *Blood* 2000; 96:3329-3333.