

# Primer estudio sobre la detección del factor V Leiden en pacientes nicaragüenses con tromboembolia venosa no provocada: informe preliminar

First study on Factor V Leiden detection in Nicaraguan patients with unprovoked venous thromboembolism: Preliminary report

Montealegre L<sup>1</sup>, Ruiz W<sup>1</sup>, Estrada S<sup>2</sup>, García K<sup>1</sup>, Santamaría C<sup>3</sup>, Puller A<sup>1</sup>, Pernudy A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular "MA. Elmer Cisneros" in memoriam, Instituto Politécnico de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.

<sup>2</sup>Hospital Escuela "Roberto Calderón", Managua, Nicaragua.

<sup>3</sup>Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera", San José, Costa Rica.

pernudi@gmail.com

Fecha recepción: 13/03/2018

Fecha aprobación: 04/07/2018



COMUNICACIÓN  
BREVE

HEMATOLOGÍA

Volumen 22 n° 2: 193-196

Mayo - Agosto 2018

**Palabras claves:** factor V Leiden, trombofilia genética, tromboembolia venosa.

**Keywords:** factor V Leiden, genetic thrombophilia, venous thromboembolism.

## Resumen

El factor V Leiden (FVL) constituye la más común de las trombofilias genéticas, se da por la sustitución de una guanina por una adenina en el nucleótido 1691 del gen que codifica para el factor V de coagulación. Como resultado, se alteran los mecanismos reguladores de la hemostasia con predominio de los procoagulantes. Se realizó un estudio de corte transversal en 21 pacientes con diagnóstico de tromboembolia venosa no provocada. Las muestras biológicas fueron analizadas mediante reacción en cadena de la polimerasa – fragmentos de restricción de longitud polimórfica (PCR-RFLP). Se detectó FVL en un 14.3% de los pacientes estudiados, todos con genotipo heterocigoto. Este informe preliminar

es el primero en pacientes nicaragüenses con tromboembolia venosa, resultando la frecuencia encontrada similar a lo publicado por otros países latinoamericanos.

## Abstract

Factor V Leiden (FVL) is the most common genetic thrombophilia. It is constituted by the substitution of a guanine by an adenine in nucleotide 1691 of the gene coding for the coagulation factor V. As a result, the regulatory mechanisms of hemostasis are altered with predominance of procoagulant mechanisms. A cross-sectional study was carried out in 21 patients with a diagnosis of unprovoked vein thromboembo-

lism. The processing of the biological samples was performed by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The FVL was detected in 14.3% of studied patients, all with heterozygous genotype. This preliminary report is the first study on Nicaraguan patients with venous thrombosis and the observed FVL frequency is comparable with previous reports from Latin America countries.

### Introducción

El FV de coagulación se codifica en el gen *F5* del cromosoma 1 (locus 1q23)<sup>(1)</sup>. La inactivación del FV mediante la PCa consiste en la degradación proteolítica de la unión en la Arg506, Arg306 y Arg679. En el caso del FVL ocurre una sustitución en la posición 506 de una arginina por una glutamina, así la PCa no reconoce la Glu506, provocando la pérdida de ese sitio de corte. Aunque la proteólisis en Arg306 y Arg679 inactiva al factor V activado (FVa), esto es 10 veces más lento, originando resistencia a la actividad anticoagulante de la PCa<sup>(2)</sup>.

El FV nativo también actúa como cofactor de PCa en la inhibición del factor VIIIa. Esta función requiere del corte del FV por la PCa en la Arg50. El FVL actúa como cofactor deficiente, por lo que no impide la producción del FXa, aumentando la concentración de trombina, lo cual ocasiona un estado de hipercoagulabilidad<sup>(3,4)</sup>.

La trombosis venosa provoca complicaciones como síndrome post trombótico (SPT) en el caso de la trombosis venosa profunda e hipertensión pulmonar en el caso de embolia pulmonar (EP)<sup>(5-7)</sup>. El FVL constituye la más frecuente de las trombofilias hereditarias, siendo más común entre la población de origen caucásico<sup>(8)</sup>. Es responsable del 95% de los casos de resistencia a la PCa<sup>(3)</sup>. En Nicaragua no se realiza el diagnóstico molecular de las trombofilias genéticas. El objetivo de esta investigación fue detectar FVL en pacientes nicaragüenses con enfermedad trombótica.

### Métodos

El estudio fue de corte transversal. La muestra fueron 21 pacientes diagnosticados con tromboembolia venosa no provocada. El tipo de muestreo fue no probabilístico por conveniencia, los criterios de inclusión utilizados fueron: paciente con historial de

tromboembolia venosa no provocada, edad del primer evento trombótico igual o inferior a los 60 años de edad y antecedentes familiares de trombosis. Se registró información sociodemográfica y clínica que se estimó conveniente para la oportuna selección de los participantes del estudio.

Esta investigación respetó los principios éticos que conciernen. Se contó con la aprobación del Comité de Ética Institucional, UNAN-Managua. Los participantes dieron su consentimiento informado.

La PCR-RFLP para la detección del FVL fue estandarizada en el Laboratorio de Biología Molecular "MA. Elmer Cisneros" *in memoriam* del Instituto Politécnico de la Salud, UNAN-Managua. La extracción de ADN se realizó usando el kit QIAamp DNA siguiendo las especificaciones del fabricante. La amplificación del FV mediante PCR punto final requirió los cebadores y condiciones de PCR descritos por Huber y col.<sup>(9)</sup>. Los componentes para el *master mix* PCR fueron de PEQLAB, además de cebadores 10  $\mu$ M (corriente arriba y corriente abajo), ADN (300 ng/ $\mu$ l) y agua libre de nucleasas hasta completar volumen final de 50  $\mu$ l. Los componentes para la digestión fueron: producto amplificado por PCR, buffer 10x y la enzima de restricción HindIII para un volumen final de 30  $\mu$ l, esto se incubó a 37 °C durante toda la noche, seguido de inactivación a 80 °C por 20 minutos. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 3% a 120V por 100 minutos. Se esperaron fragmentos de ADN de 241 bp para individuos sin FVL, 209 bp para individuos con genotipo homocigoto y de 209 y 241 bp para individuos con genotipo heterocigoto.

### Resultados

Se analizó el material genético de 21 pacientes con diagnóstico de tromboembolia venosa no provocada atendidos en el Hospital Escuela "Roberto Calderón" durante el periodo comprendido entre julio a septiembre del 2017. Las muestras fueron referidas al laboratorio para su análisis molecular mediante PCR-RFLP. Tres de los 21 pacientes resultaron portadores heterocigotos de FVL (**Figura 1**). Se detectó FVL en un 14.3% de los individuos, el restante 85.7% no presentó FVL.

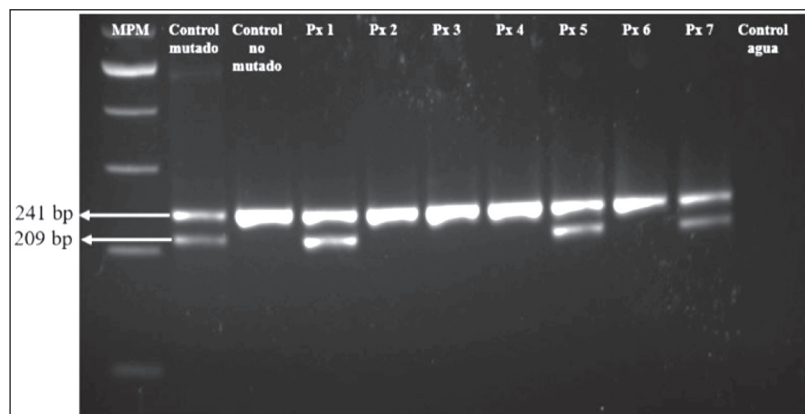


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 3%. Se observan los tres portadores heterocigotos de FVL detectados en la investigación mediante PCR-RFLP (pacientes 1, 5 y 7). MPM= marcador de peso molecular.

## Discusión

En el 14.3% de los pacientes se detectó el polimorfismo G1691A. Este porcentaje es menor al reportado por la literatura mundial, la cual establece que un 20-50% de los pacientes con trombosis venosa presentan FVL<sup>(6)</sup>, sin embargo, la cantidad de pacientes con FVL encontrado en este informe preliminar es similar a lo hallado en investigaciones realizadas en pacientes que padecen eventos tromboticos en países latinoamericanos. Por ejemplo, en Argentina y Colombia la prevalencia hallada en pacientes con tromboembolismo venoso fue alrededor del 10%<sup>(8,10)</sup>. Por su parte, en Chile y Venezuela se reportó aproximadamente un 18% de pacientes que presentan el polimorfismo<sup>(4,11)</sup>.

Todos los pacientes con FVL presentaron genotipo heterocigoto, lo cual incrementa el riesgo trombotico hasta ocho veces más<sup>(3,6)</sup>. Por tratarse de una enfermedad multifactorial, el riesgo al desarrollo de trombosis incrementa cuando FVL va acompañada de otro factor, ya sea genético (mutación de la protrombina G20210A, deficiencia de proteína C, proteína S o antitrombina) o adquirido (embarazo, cirugía, inmovilización, ingesta de anticonceptivos orales, edad avanzada, obesidad, cáncer, entre otros)<sup>(7,12)</sup>.

En ninguno de los pacientes con FVL se encontró comorbilidad asociada que representara un factor de riesgo claramente identificable, persistente y no modificable que conllevara a los episodios tromboticos, tampoco se reconocieron factores de riesgo circunstanciales.

El individuo del sexo masculino tenía 55 años de edad con cuatro eventos de TVP y uno de EP. Las dos pacientes del sexo femenino tenían 19 y 46 años de edad, con dos y tres eventos tromboticos respectivamente, ambas sin antecedentes de pérdida

gestacional, destacando la paciente de 46 años por presentar un episodio de EP.

Con respecto al 85.7% de los pacientes que no presentaron FVL, el resultado obtenido sugiere que los eventos tromboticos se deben a otra trombofilia ya sea hereditaria o adquirida. El hecho de que sean negativos para FVL no garantiza que tengan un factor V normal, pues existen mutaciones en otros nucleótidos del gen que codifica para el FV. No obstante, esta posibilidad es muy baja comparada con otras alteraciones genéticas que predispongan al estado hipercoagulable, pero en todo caso de epidemiología menos frecuente, tal como la mutación de la protrombina G20210A o defectos genéticos en la PC, PS o AT. Otras posibles causas incluyen las trombofilias adquiridas, por ejemplo, el síndrome antifosfolípido.

Al comparar las poblaciones de los pacientes con y sin FVL se puede notar que el EP resultó más frecuente en los pacientes portadores de la alteración genética en estudio, también el número de eventos tromboticos recurrentes fue mayor en los pacientes con FVL que en aquellos negativos para el polimorfismo. Los pacientes con FVL tuvieron su primer episodio trombotico a edades más tempranas que aquellos sin FVL. En los pacientes negativos para FVL se encontraron condiciones clínicas asociadas que incluyeron obesidad, anticoncepción oral e inmovilización prolongada (**Tabla 1**).

Finalmente, es necesario mencionar que la detección del FVL en pacientes con tromboembolismo venoso no provocado constituye un informe preliminar que notifica acerca de los primeros hallazgos del polimorfismo G1691A en Nicaragua. Se considera necesario la realización de futuros estudios en esta misma línea de investigación en donde se haga

posible el estudio de una población control normal lo suficientemente grande para conocer la prevalencia del FVL en Nicaragua y poder establecer el rol

que tiene la presencia del FVL como factor genético de riesgo trombótico en la población nicaragüense.

**Tabla 1.** Características clínicas y demográficas de los pacientes en estudio.

	Pacientes con FVL		Pacientes sin FVL	
	Masculino n=1	Femenino n=2	Masculino n=8	Femenino n=10
Edad ( $\bar{X} \pm DE$ )	55	19 y 46	47.1 $\pm$ 8.4	44.6 $\pm$ 9.0
Eventos trombóticos ( $\bar{X}$ )	4	2.5	2.6	2.5
Edad del primer evento trombótico ( $\bar{X} \pm DE$ )	20	17 y 25	31.4 $\pm$ 2.9	29.9 $\pm$ 2.1
Embolismo pulmonar	1 (100%)	1 (50%)	1 (12.5%)	-
Obesidad	-	-	2 (25%)	4 (40%)
Anticoncepción oral	-	-	-	3 (30%)
Inmovilización prolongada	-	-	1 (12.5%)	-

#### Fuente de financiamiento

Fondos para Proyectos de Investigación (FPI) otorgados al investigador principal Dr. Allan Pernudi, UNAN-Managua.

#### Declaración de conflictos de interés:

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

#### Bibliografía

- Hernández H, Usme S, Yunis, J. Genotipos frecuentemente asociados a trombofilias. *Biomédica*. 2014; 34(1):132-142.
- Bertina R, Koeleman B, Koster T y col. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994 Mayo; 369 (1): 64- 67.
- Venegas M, Conte G, Cuneo M. Detección de las mutaciones Factor V Leiden y Protrombina G20210A en Pacientes con Trombosis Venosa. *Revista HCUCh*. 2006; 17(1):141-147.
- López T, Delgado V, Puentes D y col. Frecuencia de la mutación del Factor V Leiden y protrombina G2021A en pacientes con tromboembolismo venoso. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud*. 2007; Diciembre; 11 (3): 33-41.
- Altuna D, Ceresetto J, Fassi D y col. Trombofilias. *Hematología*. 2012; 42 (1): 473,481.
- Tirado M. Análisis de la trombofilia hereditaria: Contribución de factores genéticos en la predisposición al tromboembolismo venoso en la población española. [Tesis para optar al grado de Doctor en Farmacia]. España. Universitat de Barcelona; 2004. Disponible en: [http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/36618/1/TESIS\\_ISABEL\\_TIRADO.pdf](http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/36618/1/TESIS_ISABEL_TIRADO.pdf)
- Kujovich J. Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med*. 2011; 13 (1):1-16.
- Iglesias M, Adamczuk Y, Forastiero R y col. Major and Potential Prothrombotic Genotypes in a Cohort of Patients With Venous Thromboembolism. *Thrombosis Research*. 2001; 104(1): 317-324.
- Huber S, McMaster K, Voelkerding K. Analytical Evaluation of Primer Engineered Multiplex Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism for Detection of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2000; 2 (3): 153-157.
- Torres J, Cardona H, Alvarez L y col. Inherited Thrombophilia is Associated With Deep Vein Thrombosis in a Colombian Population. *American Journal of Hematology*. 2006; 81(1): 933-937.
- Srur E, Vargas C, Salas S y col. Trombofilia primaria: detección y manifestación clínica en 105 casos. *Rev Méd Chile*. 2004; 132(1): 1466-1473.
- Méndez M, Salazar L, Porras J. Trombofilia primaria: Mejorando el diagnóstico basado en evidencia. *Rev Costarr Cardiol*. 2013; 15 (2): 25-30.