

Prevalencia de la mutación del factor V de la coagulación (factor V Leiden) en donantes de banco de sangre en cuatro ciudades colombianas

Andrés Varela , Amaia Bilbao, Carlos Fernando García, Monica Duarte, Ricardo Zerda, Marcela Salazar · Santafé de Bogotá. Eduardo Egea · Barranquilla

Introducción: la resistencia a la proteína C activada es el factor de riesgo genético más frecuente en los casos de tromboembolismo en la población caucásica, siendo responsable de aproximadamente 20 a 60% de los casos de trombofilia familiar. La sustitución de arginina (R) por ácido glutámico (Q) en la posición 506 del factor V de la coagulación, mutación denominada factor V Leiden, se encuentra en 95% de los casos de resistencia a la proteína C activada. Estudios en diferentes poblaciones alrededor del mundo han demostrado que esta mutación se encuentra restringida a las poblaciones con origen o mezcla de genes caucásicos.

Objetivo: determinar la prevalencia de la mutación del factor V de la coagulación (factor V Leiden) en donantes de banco de sangre de cuatro ciudades colombianas.

Material y métodos: en este estudio fueron genotipificados 495 individuos seleccionados dentro de un grupo de donantes de banco de sangre, distribuidos de la siguiente manera: 370 de Santafé de Bogotá, 50 de Barranquilla, 45 de Bucaramanga y 30 de Medellín.

Resultados: se encontró una prevalencia del factor V Leiden de 1,44% en la población estudiada.

Conclusión: la mutación del factor V, factor V Leiden, se encuentra presente en la muestra estudiada, y es un riesgo que debe ser investigado en pacientes con trombosis idiopática

Palabras clave: tromboembolismo, proteína C activada, factor V, mutación, factor V Leiden. (*Acta Med Colomb* 2000;25:2-5).

Introducción

El tromboembolismo venoso profundo es un problema de salud pública en todo el mundo. En nuestro medio, en el estudio de Dennis y colaboradores (1), se encontró que en un grupo de 696 pacientes hospitalizados en los servicios de medicina interna, cirugía y ortopedia, 7% presentó al menos un episodio de trombosis venosa profunda durante su hospitalización. Teniendo en cuenta la morbimortalidad en los pacientes hospitalizados, se ha intentado la identificación de los factores de riesgo para iniciar una terapia anticoagulante en caso necesario. Sin embargo, en Colombia son muy pocos los estudios que se han realizado acerca de la importancia de los factores genéticos en la trombosis venosa. La resistencia heredada a la proteína C activada (APC) es el factor de riesgo más importante en poblaciones caucásicas, tanto europeas como norteamericanas (2).

La resistencia a la APC representa 21% de los casos de trombosis venosa profunda (TVP) en menores de 70 años y más de 50% de los casos de trombosis venosa familiar (3, 4) en series de Estados Unidos y Europa, lo cual la convierte en la causa genética más común de las trombofilias. Más de 95% de los casos de resistencia a la APC son causados por una mutación puntual en el factor V de la coagulación,

Dr. Andrés Varela: Microbiólogo. Miembro Asociado Corporación CorpoGen. Santafé de Bogotá; Amaia Bilbao: Estudiante. Facultad de Medicina, Universidad de Navarra, Pamplona (España); Dr. Carlos Fernando García: Jefe Sección de Inmunología, Departamento de Patología y Laboratorios, Fundación Santa Fé de Bogotá. Profesor Asistente, Departamento de Patología, Universidad Nacional de Colombia; Dra. Mónica Duarte: Hematóloga, Fundación Santa Fe de Bogotá; Dr. Eduardo Egea: Director, Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular, Universidad del Norte, Barranquilla; Ricardo Zerda: Biólogo, Departamento de Patología, Fundación Santa Fe de Bogotá; Dra. Marcela Salazar: Miembro Consultor, Departamento de Patología, Fundación Santa Fe de Bogotá. Miembro Activo Corporación CorpoGen.

localizada en la posición 1691 en donde una guanina es sustituida por adenosina, la que produce un cambio en el aminoácido 506 que pasa de arginina (R) a ácido glutámico (Q) (5). Los heterocigotos para esta mutación tienen un riesgo de trombosis venosa siete veces mayor que el de la población general y los homocigotos son ochenta veces más susceptibles (6, 7).

La incidencia del factor V Leiden presenta variabilidad geográfica. La mayor frecuencia de heterocigotos y homocigotos para esta mutación se encuentra en los países europeos donde la frecuencia alélica de FV: Q506R en la población general es de 4% (8). Esta frecuencia se encuentra aumentada en el sur de Suecia (8%) y en Grecia (7%) mientras que en España la frecuencia es de 3,3% (9). En América del Norte la frecuencia alélica de la mutación alcanza entre 3% y 6% (10) de acuerdo con la serie estudiada, mientras que en Latinoamérica la prevalencia es variable: en controles del sur del Brasil la prevalencia es de 3% (11), en Argentina de 5%, en Costa Rica de 2% y en Venezuela de 1,65% (12). Existen datos de indígenas peruanos y de la población jamaicana con una prevalencia de 0%. En Asia Menor se encontró una frecuencia de 0,6% mientras que en África, sudeste asiático y Australia la frecuencia es de 0% (8).

En este estudio fueron genotipificados 495 individuos de diferentes regiones colombianas, seleccionados dentro de los donantes de bancos de sangre, con el fin de determinar la prevalencia del factor V Leiden en la población estudiada.

Material y métodos

Sujetos

Se estudiaron muestras de sangre pertenecientes a 495 individuos de cuatro ciudades colombianas. Los controles se obtuvieron de muestras de conveniencia obtenidas al azar dentro de los donantes de banco de sangre. Trescientos setenta individuos eran provenientes de la ciudad de Bogotá, 50 de Barranquilla, 45 de Bucaramanga y 30 de Medellín. La variabilidad en el tamaño de la muestra en las diferentes ciudades se debe a la dificultad de conseguir un número mayor de muestras en las ciudades fuera de Santafé de Bogotá.

Extracción de ADN

El ADN genómico fue aislado de los leucocitos de sangre periférica mediante el método de *salting out* (13).

Reacción de PCR

Se amplificaron 200 ng de DNA en un volumen final de 20 ml, en la siguiente mezcla: 3 mM de MgCl₂, 0.125 mM de cada uno de los dNTPs, 10 pmol de cada uno de los iniciadores (Tabla 1), 0.5 unidades de Taq polimerasa, 16.6 mM de sulfato de amonio, 50 mM Tris HCL pH 8.0 y 10 mM de B-mercaptoetanol. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer 2400: 95°C por cinco minutos, seguido por 30 ciclos con temperaturas

decrecientes de anillaje. Los primeros cinco ciclos: 95°C (30 seg), 62°C (20 seg) y 72°C (20 seg); los siguientes diez ciclos: 95°C (30 seg), 60°C (20 seg) y 72°C (20 seg) y por último 15 ciclos a 95°C (30 seg), 58°C (20 seg) y 72°C (20 seg) con un tiempo final de elongación de 72°C por cuatro minutos. El producto de PCR fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 3% para observar la calidad de la amplificación. El tamaño de la banda amplificada fue de 267 pares de bases correspondientes al exón 10 del gen de factor V ubicado en el cromosoma 1.

PCR-SSOP

Para determinar la presencia o ausencia de la mutación se empleó la técnica de SSOP (Sequence Specific Oligo Probes). Se colocaron 5 µl del producto amplificado en una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim), el ADN se desnaturalizó con NaOH 0.4 N; se estabilizó con SSC 10X y se entrecruzó en un *cross-linker* (UV Stratalinker 1800). Las membranas fueron prehibridizadas en 2% de agente bloqueo, 6X SSC, 0.1% de N-lauryl-sarcosine y 0.02% de SDS por una hora a 43°C. Posteriormente se añadieron las sondas (1005 y 1006) marcadas con digoxigenina a una concentración final de 4 pmol/ml: la 1005 complementaria para la mutación del factor V Leiden y la 1006 complementaria para la secuencia normal (Tabla 1) (5). Las membranas fueron hibridadas a 43°C por 18 horas. Posteriormente fueron lavadas con SSC 2X, 0.1% SDS por cinco minutos a temperatura ambiente y se realizó un lavado astringente durante 40 minutos en SSC 5X y 0,1% de SDS a una temperatura de 53°C para la sonda 1005 y 55°C para la sonda 1006. Las membranas fueron bloqueadas durante una hora en una solución de reactivo de bloqueo al 2% en 0.1M de ácido maleico y 0.15M de NaCl, pH7.5. La detección de las sondas se llevó a cabo con un fragmento de anticuerpo (Fab) antidigoxigenina (Boehringer-Mannheim) marcado con fosfatasa alcalina a una dilución 1/5000. El exceso de anticuerpo fue eliminado mediante dos lavados consecutivos en 0.1 M ácido maleico, 0.15 M NaCl, 0.3% Tween-20. Las membranas fueron incubadas por cinco minutos en una solución de 0.05 M de MgCl₂, 0.1 M de NaCl y 0.1 M de Tris, pH9.5 y posteriormente se incubaron por un minuto en una solución con CDO-Star (1:100) y fueron expuestas durante 30 minutos en una placa de autorradiografía Kodak.

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores y las sondas empleadas.

	Secuencia 5' - 3'	Referencia
Iniciador		
PR - 6967	TgC CCA gTg CTT AAC Aag ACC A	5
PR - 990	TgT TAT CAC ACT ggT gCT AA	5
Sonda		
1005 (A 506)	Tgg ACA ggC Aag gAA TAC	5
1006 (Q 506)	Tgg ACA ggC gag gAA TAC	5

Resultados

1. Identificación de la mutación del factor V mediante D7F1GGCD"

La Figura 1 muestra un ejemplo de ocho individuos genotipificados mediante la técnica de PCR-SSOP. Uno de ellos, el número seis, muestra señales positivas con ambas sondas (la 1006 y la 1005) siendo por lo tanto heterocigoto para la mutación. Los otros individuos sólo muestran una señal positiva con la sonda 1006 y por lo tanto son tipificados como normales. De los 495 individuos estudiados siete fueron positivos con las sondas 1005 y 1006; los 488 restantes sólo mostraron señal con la sonda 1006.

Sección de código de barras: **&": fYW YbWjUXY"Ua i HUWjCb`XY"ZUhc f`J`Yb"Ug` dcV`UWjcbYg`Ygh XJUXUg"**

Los resultados obtenidos en las diferentes ciudades se muestran en la Tabla 2. La frecuencia alélica de la mutación del factor V Leiden en tres de las cuatro ciudades

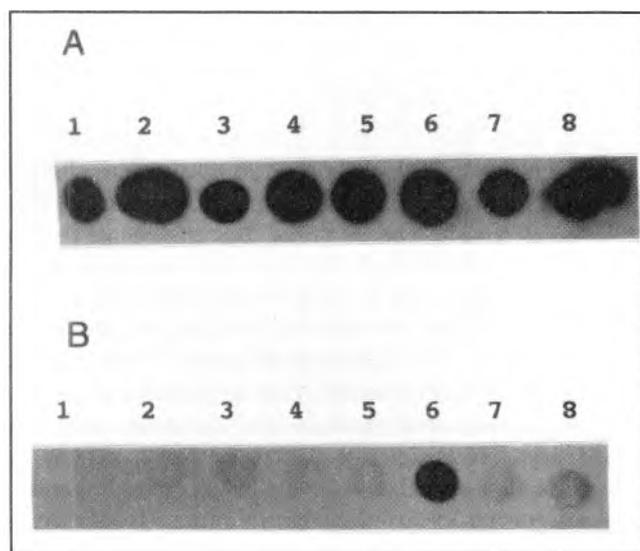


Figura 1. Autorradiografía de la hibridación del fragmento de PCR en ocho individuos diferentes (1-8). En el panel superior (A), la membrana fue hibridada con la sonda 1006 complementaria a la secuencia normal del factor V; mientras que en el panel inferior (B) se empleó la sonda 1005 complementaria a la secuencia mutada. Ambas sondas fueron marcadas con digoxigenina (DIG). La detección se hizo con el anticuerpo Anti-DIG marcado con fosfatasa alcalina y el sustrato quemiluminiscente CDP*. El individuo localizado en la posición seis es heterocigoto para la mutación ya que muestra señal con ambas sondas. Los otros sujetos no poseen la mutación ya que la señal es positiva solamente con la sonda 1006.

estudiadas es de 0%, mientras que en Bogotá esta frecuencia aumenta hasta 0.94% similar a la informada para otros países latinoamericanos. La prevalencia por lo tanto es de 1,89% en Santafé de Bogotá y de 1.44% para el total de las muestras investigadas.

Discusión

La mutación del factor V, factor V Leiden, se encuentra presente con una alta frecuencia en las poblaciones caucasoides europeas y sin embargo está virtualmente ausente en las poblaciones orientales y africanas. Esta distribución sugiere que la mutación se puede haber originado recientemente en la población europea y se ha dispersado hacia el resto del mundo mediante migraciones. La población latinoamericana es el producto de una mezcla de razas: amerindios, españoles, negros africanos y más recientemente nuevas migraciones europeas. Es por esto que la prevalencia del factor V Leiden en estas poblaciones varía de acuerdo con el grado de mestizaje de las mismas.

Los datos que encontramos en este estudio muestran dos poblaciones diferentes desde el punto de vista de la frecuencia del factor V Leiden. Por una parte, la población estudiada de Santafé de Bogotá muestra una prevalencia de 1.88%, comparable a la informada en varios estudios de Latinoamérica y Europa, mientras que en las otras ciudades estudiadas (Medellín, Bucaramanga y Barranquilla) no encontramos portadores de esta mutación en las 125 muestras estudiadas. La ausencia del alelo mutante en otros centros metropolitanos importantes del país puede deberse al pequeño tamaño de la muestra estudiada, o a la mayor tasa de inmigración en Santafé de Bogotá; además, es muy factible que estos portadores sean descendientes de inmigrantes europeos establecidos no hace muchas generaciones en el país.

Por otra parte, en un estudio realizado en 44 pacientes hospitalizados con diagnóstico de trombosis venosa profunda, tromboembolismo pulmonar y ACV de origen primario, se encontró que la incidencia del factor V Leiden era de 23% (manuscrito enviado a publicación). Estos datos sugieren que aunque el factor V Leiden no es una mutación tan frecuente en nuestro medio como lo es en poblaciones europeas, es uno de los factores que deben ser considerados en el estudio de todo paciente con trombosis idiopática o trombofilia familiar, especialmente en el caso de aquéllos

Tabla 2. Prevalencia del factor V Leiden en cuatro ciudades de Colombia.

Ciudad	Tamaño de la muestra	Heterocigotos	Homocigotos (%)	Prevalencia (%)	Frecuencia alélica
Barranquilla	50	0	0	0	0
Bucaramanga	45	0	0	0	0
Medellín	30	0	0	0	0
Santafé de Bogotá	370	7	0	1,89	0,94
Total	495	7	0	1,44	0,72

En el cálculo de la frecuencia alélica, el denominador es el número de cromosomas, equivalente al doble del número de individuos.

con antecedentes familiares o personales de episodios tromboembólicos.

En conclusión, la identificación de la mutación del factor V, el factor V Leiden, debe tenerse en cuenta en el estudio de las trombofilias familiares e idiopáticas; aunque su prevalencia en la población colombiana no es tan alta como en los países europeos, sí se encuentra presente y su frecuencia aumenta en los pacientes con episodios trombóticos. La determinación de la mutación mediante PCR es un estudio relativamente sencillo y que además presenta la ventaja de poderse realizar en pacientes bajo terapia anticoagulante. Esta característica es de gran importancia, ya que los pacientes que presentan un episodio de trombosis venosa profunda o tromboembolismo pulmonar son anticoagulados inmediatamente, lo cual impide realizar el estudio funcional de la proteína C activada.

Summary

Introduction: resistance to activated protein C (APC) is the most common genetic risk factor for venous thromboembolism in the Caucasian population; it is responsible for 20-60% of the cases of familiar thrombosis. The substitution of Arg 506 to Gin in position 1691 of the coagulation factor V gene (factor V Leiden) is detected in more than 95% of the cases of APC resistance. Worldwide studies have shown that this mutation is restricted to individuals of European Caucasian origin, or in populations with an admixture of caucasian genes.

Objective: to determine the prevalence of the mutation in Factor V, Factor Leiden, in normal donors of blood banks from four Colombian cities.

Material and methods: in this study 495 individuals were genotyped. The population investigated was selected from blood banks donors. Subjects were distributed as follow: 370 from Santafé de Bogotá, 50 from Barranquilla, 45 from Bucaramanga y 30 from Medellín.

Results: we found a prevalence of 1.44% of factor V Leiden in the population investigated.

Conclusion: the mutation of factor V, factor V Leiden, has been found in our population. It should be investigated in the patients with a diagnosis of idiopathic thrombosis.

Key-words: activated protein C, thromboembolism, factor V Leiden.

Referencias

1. Dennis R, Arboleda MN, Rodríguez MN, Salazar MS, Posada PS. Estudio nacional sobre tromboembolismo venoso en población hospitalaria en Colombia: diferencias entre ciudades y especialidades. *Acta Med. Colomb* 1996;**21**:55-63.
2. Bauer K. Hypercoagulability - A new cofactor in the protein C anticoagulant pathway. *N Engl J Med* 1994; **330**: 566-567.
3. Griffin JH, Evatt BL, Wideman C, Fernández JA. Anticoagulant protein C pathway defective in a majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993;**82**:1989-1993.
4. Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; **330**: 517-521.
5. 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.
6. Koster T, Rosendaal FR, De Ronde F, Brillt E, Vandembroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor response to activated protein C: Leiden thrombophilia study. *Lancet* 1993;**342**:1503-1506.
7. Majerus PW. Bad blood by mutation. *Nature* 1994;**369**:14-15.
8. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995;**346**:1133-1134.
9. García-Gala JM, Alvarez V, Pinto CR, Soto I, Urgellis MF, Menendez MJ, Carracedo C, López-Larrea C, Coto E. Factor V Leiden (R506Q) and risk of venous thromboembolism: a case-control study based on the Spanish population. *Clin Genet* 1997;**52**:206-210.
10. 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 venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995;**332**:912-917.
11. Arruda VR, Annichino-Bizzachi JM, Costa FF, Reitsma PH. Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a Brazilian population. *Am J Hematol* 1995;**49**:243-245.
12. Herrman FH, Koesling M, Schroder W, Altman R, Jimenez R, Lopaciuk S, Perez-Requejo JL, Singh JR. Prevalence of factor V Leiden mutation in various populations. *Genet Epidemiol* 1997;**14**:403-411.
13. Miller KB, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988;**85**:1215.