

## Diagnóstico molecular de trombofilia, experiencia en Panamá

Sotillo-Bent L, Cedeño-Escudero J

Caja del seguro Social, Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid, Laboratorio de Genética, Ciudad de Panamá, Panamá.

Email: sotillo@cwpanama.net

### INTRODUCCIÓN

El término trombofilia se utiliza para denominar diversas condiciones genéticas, adquiridas o ambas a la vez, que predisponen a desarrollar trombosis, que es la formación de coágulos en venas o arterias. Tanto la trombosis arterial como la venosa son ejemplo de enfermedades complejas en las que diversas vías biológicas contribuyen al riesgo de desarrollar esta enfermedad como por ejemplo la presión sanguínea, la coagulación, inflamación y aterogénesis.

Un 80 % de las veces se puede identificar el factor de riesgo de trombosis y existe más de un factor implicado en el mismo paciente. Aproximadamente el 50% de los eventos en pacientes con trombofilia hereditaria se asocian con factores de riesgos adquiridos como cirugías, embarazo y anticonceptivos orales

La clasificación de la trombofilia según su etiología es:

- *Trombofilia primaria*: se define como una tendencia determinada genéticamente a desarrollar trombosis. El defecto hereditario más frecuente es la resistencia a la proteína C activada, pero existen otras causas como son la deficiencia de antitrombina III, deficiencia de proteína S, resistencia a la proteína activada asociada a la mutación del FV Leiden, deficiencia del activador del plasminógeno y otros
- *Trombofilia secundaria*: corresponde a una serie de trastornos adquiridos en los que existe mayor riesgo de desarrollar trombosis. El riesgo trombótico aumenta cuando se asocian situaciones de riesgo tales como el síndrome antifosfolípidos, hiperhomocisteinemia por

déficit vitamínico, cirugía, traumatismos, inmovilización prolongada, tratamientos hormonales, obesidad, embarazo y puerperio.



En los últimos años se ha venido estudiando la trombosis en sus diversas manifestaciones como una causal preocupante de la morbimortalidad en pacientes con riesgo. Resulta conocida la asociación de trastornos de la coagulación al embarazo y otras patologías.

Se presenta la experiencia interdisciplinaria de los Servicios Obstetricia, Hematología y Genética del Complejo Hospitalario Metropolitano Dr. Arnulfo Arias Madrid de la Ciudad de Panamá, República de Panamá en el que el Servicio de Genética ofrece estudios de Biología Molecular con tecnología de punta en el diagnóstico de trombofilia genética o adquirida en mujeres con Perdida Gestacional Recurrente de la Consulta de Alto Riesgo Obstétrico en el Complejo Hospitalario Metropolitano Dr, Arnulfo Arias Madrid de la Caja de Seguro Social en Panamá.

## **OBJETIVO**

Determinar la frecuencia de mutaciones relacionadas al FV Leyden, factor II y MTHFR en mujeres embarazadas con perdida gestacional recurrente (PGR) y otros pacientes con eventos tromboticos atendidos en el Complejo Hospitalario de la Caja del Seguro Social en Panamá.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

Se inicia el estudio en el año 2014 con 320 muestras de sangre completa con EDTA obtenidas en el Laboratorio de Genética del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid de la Caja del Seguro Social de Panamá, las cuales se clasificaron en *Grupo A estudio*: 55 mujeres con historia de 2 o más PGR; *Grupo A control*: 55 mujeres sin PGR; *Grupo B estudio*: 105 pacientes referidos por eventos tromboembólicos y *Grupo B control*; 105 individuos panameños sin historia de trombosis. Se suman a esta muestra todas las realizadas hasta el año 2016 en el laboratorio de Genética de la Caja del Seguro Social, dando un total de 2701 muestras analizadas por Trombofilia.

A todas las muestras se le realizaron la detección cualitativa *in vitro* simultánea de mutaciones del FV Leiden (R506Q), de la protrombina (factor II 20210A) y de la metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR C677T) en DNA extraído de sangre entera (conservada con EDTA).

Las extracciones de ADN se realizaron con kits de columnas Qiamp DNA Blood Mini Kit en el sistema automatizado para extracción de ácidos nucleicos QIACUBE. Se utilizó para la amplificación y la detección el Kit Elucigene TRP (prueba de riesgo de trombosis), el método empleado por la prueba Elucigene TRP se basa en el sistema de mutaciones refractarias a la amplificación (ARMS), una tecnología de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica de los alelos que puede detectar mutaciones puntuales o pequeñas eliminaciones en el ácido desoxirribonucleico (DNA). La amplificación fue realizada según el fabricante del kit en equipos de PCR punto final y la detección se realizó en el sistema automatizado de electroforesis capilar Qiaxcel.

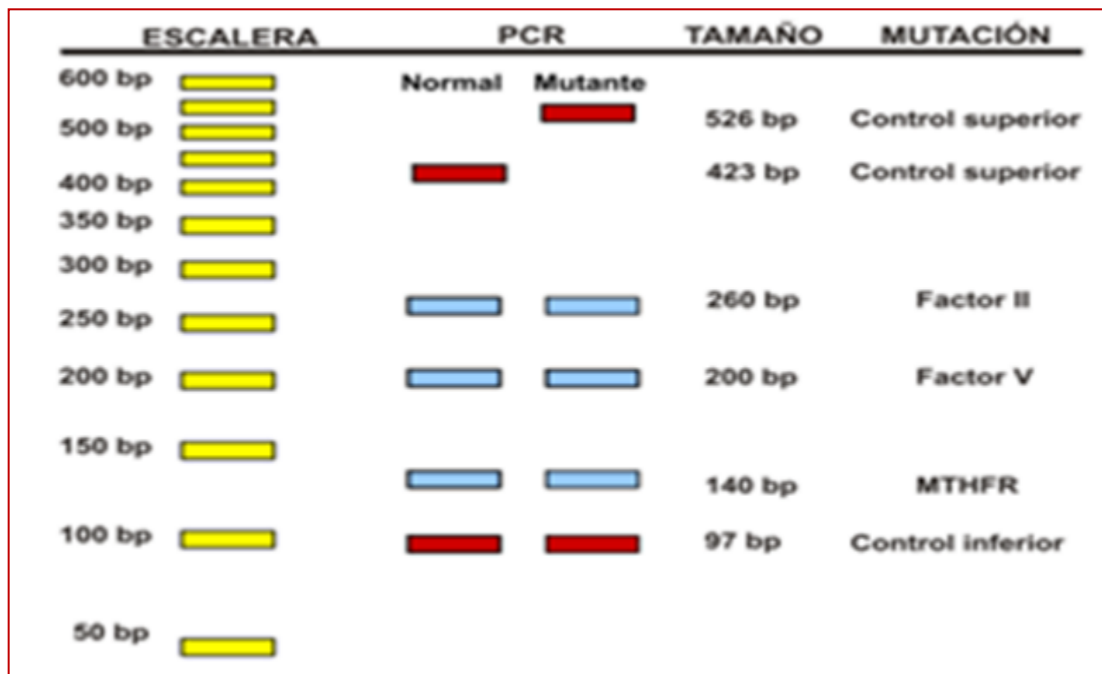
La interpretación de los resultados se basó en las indicaciones del fabricante para las diferentes bandas incluyendo los controles internos.

## RESULTADOS

La figura muestra un diagrama del tamaño, en pares de bases y la ubicación relativa de los productos de la PCR en un gel que se espera para un genotipo de trombosis heterocigótico (con mutaciones del factor V, el factor II o la MTHFR) utilizando el reactivo de la prueba de riesgo de trombosis.

Para el grupo de pacientes con trombosis analizados al inicio en el 2014 (320 pacientes) se encontraron los siguientes resultados:

- ✓ *Factor V*: asociación de trombosis de 7 veces cuando se tiene la mutación. OR=7.43. Prevalencia de 3.3 % pacientes y 0.5 % control.
- ✓ *Factor II G20210A*: asociación de trombosis de 2 veces (OR = 2.58) y prevalencia de 2.4 % pacientes trombosis y de 1.0 % control.
- ✓ *MTHFR C677T*: asociación de trombosis OR =0.85 y prevalencia de 37.6 % pacientes



**Figura.** Diagrama de un genotipo de trombosis heterocigótico utilizando el ElucigeneTRP (Pruebas de Riesgo de Trombosis)

Los resultados obtenidos hasta el 2016 de los 2 701 pacientes analizados fueron los siguientes:

- ✓ *Factor V*: homocigoto normal; 98,52 % (2 661 pacientes); heterocigoto mutado 1,44 % (39 pacientes); homocigoto mutado 0,04 % (1 paciente).
- ✓ *Factor II*: homocigoto normal, 98,18 % (2 652 pacientes); heterocigoto mutado 1,78 % (48 pacientes); homocigoto mutado 0,04 % (1 paciente).
- ✓ *MTHFR*: homocigoto normal un 34,14 % (922 pacientes); heterocigoto mutado 48,80 % (1 318 pacientes); homocigoto mutado 17,07 % (461 pacientes)

Se pudo identificar un factor de riesgo en la mayoría de los pacientes con tromboembolismo, congénitos y adquiridos, frecuentemente existe más de un factor implicado. Los factores de

riesgo adquiridos más importantes son cirugías recientes, trauma, inmovilización, anticoagulante lúpico, niveles elevados de anticuerpos antifosfolípidos, neoplasias, anticuerpos orales y síndrome mieloproliferativos.

Las causas hereditarias más frecuentes son la mutación de la MTHFR, FV Leyden y el factor II (gen de la protrombina). En nuestro estudio la mutación más predominante, ya sea en su forma heterocigoto u homocigoto fue la de la MTHFR con 65,87 % del total de los pacientes.

Se detectó una fuerte asociación (riesgo de 7 veces) del FV Leiden como causa de la trombosis en los pacientes con eventos tromboembólicos y menor asociación con la mutación del factor II G20210A (riesgo de 2 veces).

La mutación es una condición que predispone al desarrollo de la trombosis y esto va ligado a la eficiencia de los cofactores que utiliza la enzima MTHFR para realizar su función normal y mantener niveles adecuados de la homocisteína.

## CONCLUSIONES

La detección de factores hereditarios, facilita a los clínicos decidir sobre la instauración de terapias de anti coagulación, duración del tratamiento y estudios de extensión a otros miembros de la familia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rogier MB. Genetic Approach to Thrombophilia, *Thromb Haemost* 2001; 86: 92–103.
2. ElucigeneTRP (Pruebas de Riesgo de Trombosis), Instrucciones de uso, Elucigene diagnostics, July 2014
3. Martínez I, Valdez R, Azambuja C, Estrada N. Trombofilia Hereditaria, Prevalencia de mutaciones en el factor II, V y MTHFR en una población de donantes de sangre en Paraguay. *Anales Fac Ciencias Méd UNA*.2005; XXXVIII (4):17-29.
4. Christiansen SC. Thrombophilia, clinical Factors, and Recurrent Venous Thrombotic events. *JAMA*. 2005; 293(19): 2352-61.