

Trombofilia Congénita desde el Laboratorio

Dra. Andrea Avigliano
Dra. Marina I. Gutiérrez
Laboratorio de Análisis Clínicos
Centros Médicos Dr. Stamboulían

El mecanismo de la hemostasia está formado por una serie de proteínas reguladas por activadores e inhibidores que controlan su funcionamiento normal. Cualquier alteración o disfunción en alguno de los componentes del sistema, produce un desbalance que resulta en un aumento del riesgo de enfermedad hemorrágica o trombótica.

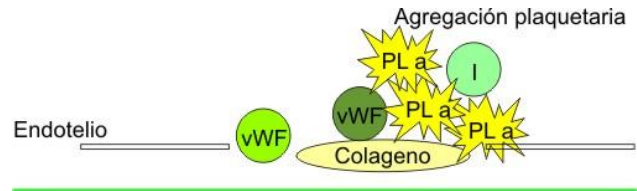
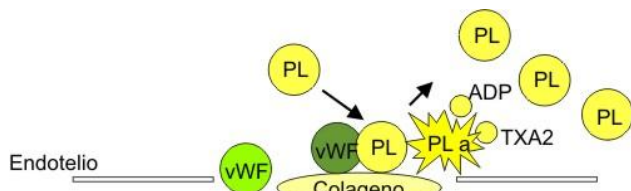
Trombogénesis

Mientras el trombo arterial se compone predominantemente de plaquetas, el trombo venoso está formado por fibrina y hematíes. Por este motivo, las estrategias que tienen como objetivo inhibir la trombosis arterial se focalizan en drogas que bloquean la función plaquetaria y, en algunos casos, se combinan con anticoagulantes que impidan la formación de fibrina. Para el tratamiento de la trombosis venosa, en cambio, los anticoagulantes son las drogas de elección. La alteración en la neutralización de la trombina, o la falla en el control de la excesiva generación de trombina causan trombosis (1). Algunos conceptos básicos antes de desarrollar el tema son:

La trombofilia se define como el trastorno de la hemostasia que se caracteriza por la tendencia a desarrollar trombosis.

La trombosis arterial se inicia por ruptura de la placa arteriosclerótica y la exposición de material trombogénico en ella. La extensión del trombo disminuye el flujo sanguíneo y favorece la deposición de más plaquetas y fibrina. La obstrucción vascular puede ocasionar trombosis en los sitios de disrupción de la placa (Figura 1):

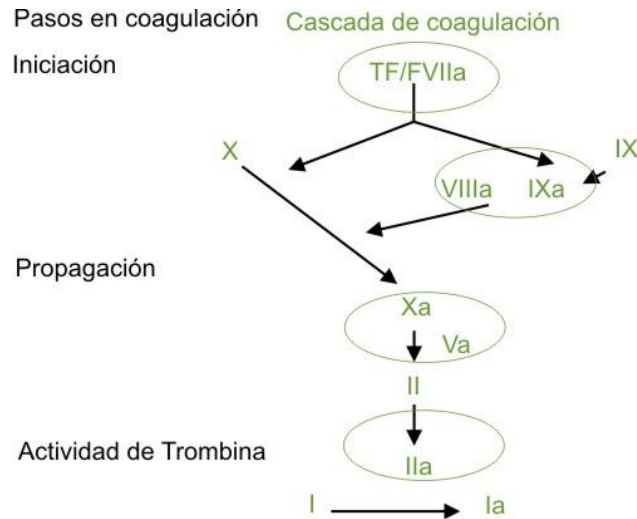
Figura 1: Formación del trombo plaquetario y mecanismo de coagulación sobre superficie plaquetaria.



Formación de Fibrina

El mecanismo de coagulación se compone de una serie de reacciones proteolíticas, donde una enzima inactiva o zimógeno es transformado a proteasa activa. Esta a su vez, ejerce su acción sobre un nuevo zimógeno del sistema. La activación en cadena de estas proteínas conduce a la etapa final del mecanismo donde la trombina generada es la responsable de activar el fibrinógeno a fibrina. (Figura 2)

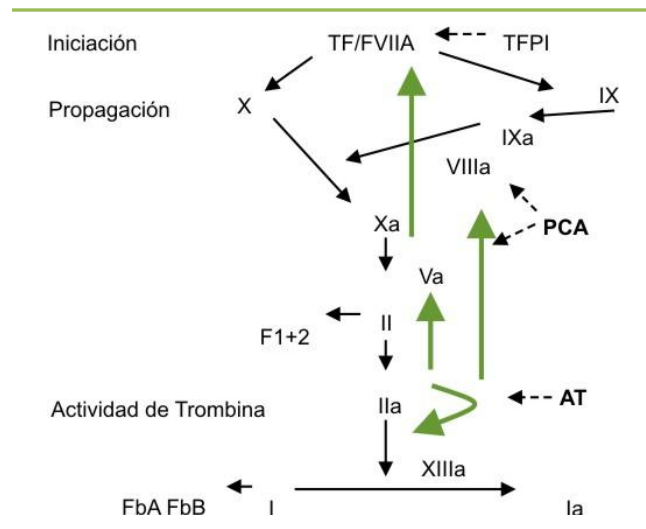
Figura 2: Mecanismo de Coagulación



La trombosis venosa ocurre cuando los estímulos procoagulantes sobrepasan los mecanismos naturales protectores antitrombóticos. Estos estímulos incluyen la excesiva activación de la coagulación, ya sea por anomalías trombofílicas comprometiendo anticoagulantes naturales, como Antitrombina (AT), Proteína C (PC) y Proteína S (PS) (Figura 3), daño de pared vascular o estasis. El aumento de la generación de Trombina (IIa)

puede también producirse en pacientes con mutaciones en el factor V o en la Protrombina.

Figura 3: Inhibidores fisiológicos



Fibrinolisis: Es el mecanismo encargado de remover la fibrina intravascular restituyendo el flujo sanguíneo. Se inicia por la acción de los activadores del sistema sobre el plasminógeno convirtiéndolo en plasmina. Esta última enzima es la principal responsable de la remoción del coágulo de fibrina y su degradación en productos solubles (pdf).

La trombosis es una enfermedad multifactorial que depende de factores de riesgo ambientales y genéticos. Algunos factores de riesgo ambientales son edad, sexo masculino, obesidad, cáncer, trauma y cirugía, inmovilización prolongada, síndrome antifosfolipídico, embarazo y el uso de anticonceptivos o terapia hormonal de reemplazo. La Tabla 1 muestra la prevalencia de los factores de riesgo genéticos en la población general, en pacientes con trombosis y el riesgo relativo que causan, según el consenso internacional. Es importante, sin embargo, tener en cuenta que distintas poblaciones (distintas etnias) tienen distinta distribución de variantes génicas. Por ejemplo, en EE.UU. el Factor V Leiden se observa en un 5% de la población caucásica mientras que sólo en un 1,2% de la afro-americana y en población asiática es más raro aún. En la población argentina se hizo un estudio donde se determinó que la prevalencia en población asintomática es 2,9% para Factor V Leiden, 2,6% para protrombina 20210A y 15,8% para el genotipo MTHFR 677TT.

Tabla 1

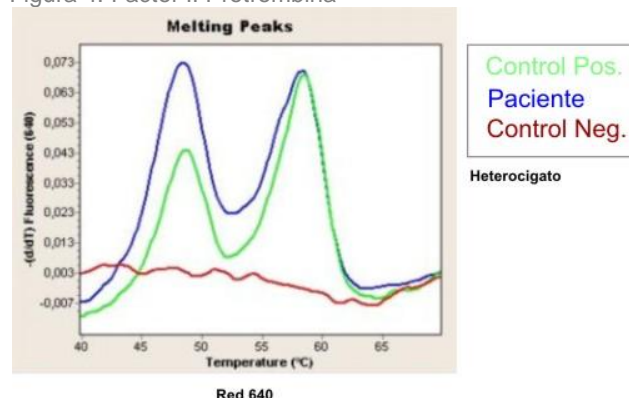
Variante génica	Prevalencia población (%)	Prevalencia pacientes con trombosis venosa (%)	Riesgo relativo
Deficiencia AT	0,07-0,16	1-3	20
Deficiencia de Proteína C	0,2-0,4	3-5	10
Deficiencia de Proteína S	0,03-0,13	1,5	10

Factor V Leiden	3-15	20	5
Factor II 20210A	1-2	4-7	2-3
Hiperhomocisteinemia	5	10	2,5

Por otra parte, los riesgos relativos se potencian y dependen de la interacción de diversos factores ocurriendo al mismo tiempo. No sólo la presencia de múltiples factores genéticos en un individuo, como Factor V Leiden + Protrombina 20210A, aumentan el riesgo de trombosis venosa (RR: 20), sino también la combinación de factores genéticos y ambientales. Un claro ejemplo de esto es la interacción entre el Factor V Leiden y el uso de anticonceptivos orales. Las mujeres heterocigotas para el Factor V Leiden que toman anticonceptivos tienen un riesgo del 34%. Esto se debe a que los anticonceptivos inducen resistencia a la Proteína C activada, empeorando el defecto bioquímico que causa el Factor V (ver más abajo).

Analizaremos ahora las condiciones que se vinculan con la predisposición genética a la enfermedad trombótica y los tests de laboratorio más frecuentes. Todas estas variantes genéticas se han podido elucidar gracias a la biología molecular y los estudios del genoma humano. Las técnicas para su identificación, en un principio, se basaron en la secuenciación de los respectivos genes, pero luego la detección de algunas mutaciones se simplificó mediante una PCR con primers específicos, y posterior digestión del producto amplificado con enzimas de restricción que permiten distinguir la secuencia del alelo normal y del mutado, ya que generan distintos tamaños de bandas en una electroforesis en gel de agarosa (PCR-RFLP). Recientemente, se ha desarrollado el análisis por PCR en tiempo real, que permite diferenciar variantes del gen en forma más rápida. Generalmente el alelo mutado demuestra una temperatura de melting menor que la del alelo normal (Figura 4) por presentar una hibridación imperfecta de la sonda.

Figura 4: Factor II Protrombina



Déficit de antitrombina (AT)

La antitrombina es una glicoproteína codificada en el cromosoma 1 que inhibe a la trombina y de los factores X, IX, XI mediante la formación de un complejo irreversible. Tiene herencia autosómica dominante. Al presente se han descrito más de 100 mutaciones responsables de este déficit. Es el factor de riesgo más potente y con alta

probabilidad de recurrencia. En la deficiencia de tipo I están reducidos el antígeno y la actividad de la proteína, en la deficiencia de tipo II, la actividad está reducida y el antígeno es normal. La deficiencia tipo III, extremadamente rara, se origina por un déficit homocigota que resulta incompatible con la vida. Se ha identificado una variante con un defecto en el sitio de unión a la heparina, que se relaciona con un muy bajo riesgo en su forma heterocigota. El diagnóstico de laboratorio se basa en la detección de un nivel de actividad del 50% en relación al plasma normal. El test de laboratorio recomendado es un ensayo de actividad de cofactor de heparina, con dos sistemas de detección disponibles: anti IIa y anti Xa.

Deficiencia de Proteína C

La proteína C es una glicoproteína que modula la generación de trombina al inactivar al factor V y VIII activados. El gen se localiza en el cromosoma 2 y se han descrito numerosas mutaciones en este gen responsables del déficit proteico, ya sea por una disminución de la traducción (tipo I) o por la síntesis de una proteína no funcional (tipo II). La herencia es autosómica dominante y los homocigotos suelen presentar eventos tromboticos fatales en el período neonatal. Se han reportado deficiencias de tipo I y II, ambas con un 50% de reducción en la actividad. Para la determinación del defecto en el laboratorio, se recomienda un ensayo funcional, usando un activador de la proteína C derivado del veneno de víbora. Se utilizan métodos de detección cromogénicos y coagulométricos.

Deficiencia de Proteína S

La proteína S es una glicoproteína plasmática codificada en el cromosoma 3 que inhibe al complejo protrombinasa y también es necesaria para la inactivación de los factores V y VIII por la proteína C. Esta deficiencia también se hereda como autosómica dominante y se han descrito más de 130 mutaciones diferentes. El homocigota está asociado a púrpura fulminans neonatal y el heterocigota puede causar trombosis venosa o arterial. Existen tres tipos de defectos: tipo I, defecto cuantitativo, tipo II defecto cualitativo (funcional) y el tipo III que presenta una reducción antigénica en la proteína S libre con un nivel de antígeno total normal. El test recomendado para screening es el ensayo antigénico para la proteína S libre. Existen distintas técnicas disponibles: Enzima-inmuno ensayo, Laurell, test turbidimétrico de partículas de látex que utilizan anticuerpos monoclonales. Los ensayos funcionales de coagulación, son una alternativa válida al ensayo antigénico de la PS libre, son sensibles para los tres tipos de defectos y son ampliamente utilizados.

Fibrinólisis

El inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), también regula la fibrinólisis inactivando el activador tisular del plasminógeno. Se ha descrito un polimorfismo de inserción/delección en el promotor (-675), 4G/5G. Su efecto en el riesgo no está esclarecido pero se piensa que el alelo 4G aumentaría el riesgo de trombosis venosa, especialmente en individuos portadores de otros defectos trombofílicos genéticos.

Factor V y resistencia a la PCA (Proteína C activada)

Es la causa más frecuente de trombofilia, causada por una mutación en el gen que codifica para el FV. El Factor V Leiden es la causa genética de trombosis venosa más común. El factor V es una glicoproteína codificada en el cromosoma 1. La resistencia a la proteína C activada se debe en la gran mayoría de los casos a una mutación puntual en el gen del Factor V, conocida como Leiden. En esta variante del Factor V hay una sustitución de una adenina por una guanina en el nucleótido 1691 del exon 10 (G1691A) que causa una sustitución de una arginina por una glutamina en el aminoácido 506. Esta mutación hace que la inactivación sea 10 veces más lenta causando una mayor producción de Trombina. El tipo de herencia de esta alteración es autosómico dominante.

Recientemente se han descrito 2 nuevas mutaciones en el exon 7 del gen del Factor V. Una, llamada Cambridge, consiste en una transición de G por C en el nucleótido 1091 causando una sustitución de una arginina por una treonina en el aminoácido 306. La otra, Hong Kong, es la transición de A por G en el nucleótido 1090 produciéndose un cambio de arginina a glicina en el aminoácido 306. La asociación de estas variantes con trombosis no se conoce.

El test de screening recomendado es la resistencia a la proteína C activada (RPCA). Se basa en la prolongación de los tiempos del APTT después del agregado de PCA. El resultado se expresa como una relación entre los dos tiempos de coagulación. Existe una modificación del test original con agregado de plasma deficiente en FV que mejora la sensibilidad hasta un 100%.

Factor II

El factor II o protrombina está codificado por un gen de 21 Kb en el cromosoma 11. La mutación del gen de protrombina consiste en el cambio de la guanina por adenosina en el nucleótido 20210 (G20210A) en la región 3' no traducida. Este cambio aumenta la eficiencia de clivaje del transcrito primario y un sitio de poliadenilación más eficiente, causando una acumulación de ARNm y, por lo tanto, mayor síntesis de proteína. Este efecto conduce a una elevación (130%) de la concentración de protrombina circulante, promoviendo a su vez la generación de trombina. Es la segunda causa más frecuente de trombofilia. Esta mutación está asociada a trombosis cerebral y un mayor riesgo de infarto de miocardio. En un estudio reciente se demostró que el riesgo de TVP en portadores de esta mutación se incrementa con la edad (individuos mayores 40 años tienen un riesgo 9 veces mayor que individuos menores de 40). Muy pocos individuos homocigotas han sido descritos en el mundo y presentan una marcada heterogeneidad fenotípica, siendo algunos asintomáticos y otros fatales en el período neonatal. No hay test de laboratorio para esta anomalía.

Hiperhomocisteinemia

La homocisteína es un aminoácido intermediario en el metabolismo de la metionina. La hiperhomocisteinemia puede ser causada por factores genéticos. La enzima metilen-tetrahidrofolato-reductasa

(MTHFR) participa en este metabolismo y una mutación descripta, C677T, conduce a una enzima termolábil de menor actividad. C677T es un polimorfismo muy común en MTHFR, que se corresponde con una substitución de una valina por alanina en la proteína (aminoácido 222). El alelo T se asocia con niveles más elevados de homocisteína, y esta elevación puede corregirse con suplementación de folato. Las causas y mecanismos de la asociación de hiperhomocisteína con trombosis son inciertos. La detección en el laboratorio se basa en Enzimo-inmunoensayos y tests inmunológicos de extinción de la fluorescencia polarizada que muestran buena correlación con el método por cromatografía (HPLC).

¿Por qué realizar estudios de trombofilia?

- Para encontrar causas bioquímicas de la enfermedad trombótica.
- Para identificar factores de riesgo que puedan ser modificados.
- Para predecir riesgo trombótico en portadores asintomáticos.
- Para determinar el riesgo de recurrencia de la enfermedad.
- Para identificar factores de riesgo de complicaciones durante el embarazo.

¿A quién realizar estudios de trombofilia?

A todo sujeto con episodio de trombosis confirmado (descartando cáncer) siempre que exista al menos una de las siguientes condiciones:

- Historia familiar de trombosis.
- Debut a edad temprana.
- Trombosis en sitios inusuales.
- Trombosis recurrente.

¿Cuándo realizar estudios de trombofilia?

En condiciones generales, el tratamiento clínico de un evento trombótico agudo no es influenciado por la demostración inmediata de un defecto específico, de manera que los tests pueden posponerse hasta que culmine el período de tratamiento inicial.

¿Por qué no realizar estudios de trombofilia en el evento agudo?

- Evento agudo: falsas disminuciones de PC y PS
- Anticoagulantes: Heparina: Disminución de AT y PC. Anticoagulantes orales: Disminución de PC y PS.
- Sólo los estudios de genotipo son confiables en esta etapa.

Como en todas las pruebas de coagulación es de suma importancia priorizar los requerimientos de la fase preanalítica, y respetar al máximo las condiciones de colección, conservación, transporte y procesado. Realizar un coagulograma básico puede ayudar en la interpretación de los resultados: TP, APTT, fibrinógeno. También es recomendable realizar hemograma con recuento plaquetario y un interrogatorio al paciente para registrar historia familiar, trombosis previa, pérdida fetal, enfermedad

cardíaca, terapia hormonal o anticoagulante y síntomas neurológicos.

Si bien en los últimos años ha habido importantes avances en el estudio de la trombofilia que han permitido al laboratorio la identificación de nuevos desórdenes, los estudios de la hemostasia se encuentran en continua expansión para comprender los mecanismos más complejos.

Bibliografía:

- Eligsohn U. Genetic susceptibility to venous thrombosis. N Engl J Med 2001, 344.
- Bauer KA. Management of thrombophilia. J Thromb Haemost 2003, 1: 1429-1434.
- Cushman M. Inherited risk factors for venous thrombosis. Hematology 2005, 452-457.
- Nicolaides EA, Breddin HK et al. Thrombophilia and venous thromboembolism. International consensus statement. Int. Angiology 2005, 24: 1-26.
- Tsantes AE, Kikopoulos GK, et al. Association between the plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism and venous thrombosis. A meta analysis. Thromb Haemost 2007, 97: 907-913.
- Genoud V, Castañón M, et al. Prevalence of three prothrombotic polymorphisms. Factor V G1691A, factor II G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C 677T in Argentina. On behalf of the Grupo Cooperativo Argentino de Hemostasia y Trombosis. Thrombosis Res 2000, 100: 127-131.

Revista N° 15 Mayo-Junio: Síndrome Metabólico.

Revista N° 16 Julio-Agosto: Trombofilia Congénita desde el Laboratorio.