
Resistencia a la proteína C activada: Una nueva causa de trombofilia

JOSÉ D. TORRES

El tromboembolismo venoso es un problema médico-serio que causa mucho sufrimiento y en ocasiones la muerte. Hay factores de riesgo circunstanciales: Cirugía, inmovilización, embarazo y uso de contraceptivos orales. Hay además factores genéticos de riesgo: Deficiencias de las proteínas C y S, antitrombina III y disfibrinogenemia. Recientemente se encontró la resistencia hereditaria a la acción anticoagulante de la proteína C activada como factor implicado en la patogénesis. En la mayoría de los casos es causada por una sola mutación en el gen del factor V. En este artículo se describen la base molecular de la mutación, las manifestaciones clínicas, los métodos de diagnóstico y las guías de manejo.

PALABRAS CLAVE

TROMBOEMBOLISMO PROTEÍNA C ACTIVADA

El término trombofilia se refiere a diversas condiciones, adquiridas o heredadas, en las que hay riesgo de trombosis arterial o venosa. Tiene una connotación opuesta a la hemofilia, término usado para agrupar diversos padecimientos en los que hay riesgo de sangrado. El término trombofilia

incluye varias situaciones clínicas descritas como estados de hipercoagulabilidad o pretrombóticos y que en último término supone un desequilibrio entre los mecanismos procoagulantes y anticoagulantes naturales. Existen varias anormalidades que pueden llevar a un estado trombofílico: Puede haber hipercoagulabilidad debida a un aumento en el número o función de las plaquetas; a incremento en los niveles o la actividad de algunos de los factores procoagulantes; a disminución en la actividad de los inhibidores fisiológicos de la coagulación y a hipofibrinólisis bien sea por disminución de la activación del plasminógeno, incremento de los inhibidores de la fibrinólisis o capacidad disminuida de lisis de la fibrina.

El tromboembolismo venoso es un problema médico serio causante de morbilidad considerable y muerte ocasional. Los padecimientos trombóticos arteriales son responsables de más de la mitad de las muertes de miembros de la sociedad actual, en especial en relación con enfermedades cardio y cerebrovasculares.

Desde el punto de vista clínico, hay algunas guías que sugieren un estado hipercoagulable o de trombofilia: Trombosis que ocurre a una edad temprana, historia familiar de enfermedad trombótica, trombo-

DOCTOR JOSÉ DOMINGO TORRES M., Profesor Asistente. Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

sis que ocurre en un sitio inusitado (trombosis venosa mesentérica, cerebral, axilar), trombosis recurrente con o sin factor precipitante aparente, trombosis recurrente durante terapia anticoagulante y necrosis cutánea inducida por warfarina.

Se reconocen dos tipos de trombofilia, la primaria o heredada y la secundaria o adquirida. Entre los estados de trombofilia primaria o heredada, los mencionados con mayor frecuencia antes de febrero de 1993 eran las deficiencias de Proteína C de la coagulación (PC), de Proteína S (PS) y de Antitrombina III (At-III). Estos tres desórdenes juntos explican en el mejor de los casos hasta un 15% de la trombofilia heredada tomando como criterios algunos de los enunciados antes como la presentación juvenil, recurrente o la historia familiar.

Las anomalías del plasminógeno se han encontrado en un 2% y las disfibrinogenemias en un 1%. Hay informes de trombosis en pacientes con deficiencias hereditarias del cofactor II de la heparina, del plasminógeno y del factor XII. Sin embargo, la asociación causal entre estas tres últimas anomalías genéticas y el riesgo aumentado de trombosis no se ha definido en forma clara.

A partir de 1993 se describió el síndrome de resistencia a la Proteína C activada (RPCA) que ha sido identificado en un 20-50% de los pacientes con trombosis venosa inexplicada y es 5 a 10 veces más común que las deficiencias de PC, PS o At-III.

Otro paso importante se dio en 1994 cuando se encontró que la hiperhomocisteinemia leve puede explicar hasta un 19% de los pacientes con trombosis venosa juvenil (1).

SISTEMA DE LA PROTEÍNA C: UN ANTICOAGULANTE NATURAL

La PC es una glicoproteína plasmática dependiente de la vitamina K, sintetizada en el hígado. El gen que la codifica contiene nueve exones y se encuentra localizado en el cromosoma 2. Su vida media es corta, de sólo 6 horas. Está compuesta por una cadena liviana y otra pesada que es la que contiene la "serpina" (serin-proteasa-inhibidor), sitio catalítico que al activarse por el complejo trombina-trombomodulina en la superficie de la célula endotelial, inactiva los factores Va y VIIIa ejerciendo de este modo su acción anticoagulante (2-5).

Activación de la Proteína C: La trombomodulina (TM) es una proteína de membrana que se une a la trombina con alta afinidad. La trombina unida a la TM es al menos 20.000 veces más eficiente en la activación de la PC que la trombina no unida. Las células endoteliales de arterias, venas, capilares y vasos linfáticos expresan TM. Debido a que el área de superficie por unidad de volumen de sangre es mucho mayor en los capilares que en los grandes vasos, la concentración de TM en la microcirculación es más de 1.000 veces más alta que en los grandes vasos. En éstos la trombina está en su estado libre, no unida, pero tan pronto la sangre penetra en la microcirculación la trombina es expuesta, se une a la TM y se activa la PC. Es de anotar que el complejo trombina- antitrombina exhibe una capacidad disminuida de clivar el fibrinógeno, activar el factor V o disparar la activación de las plaquetas. Entonces, la TM tiene la capacidad no sólo de acelerar la activación de la PC dependiente de la trombina, sino también de inhibir en forma

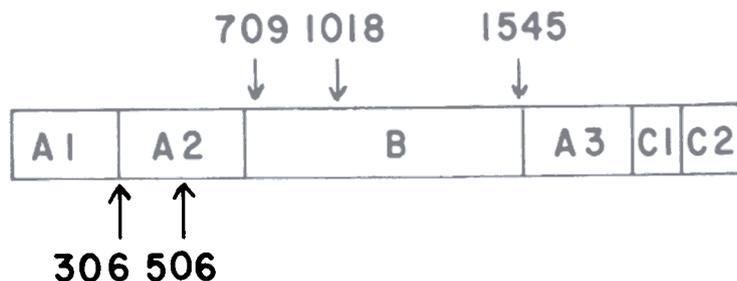


FIGURA N° 1

Representación esquemática del gen del factor V.

parcial las actividades procoagulantes de la trombina.

Sustratos de la Proteína C activada (PCA): Los factores V y VIII son glicoproteínas homólogas de alto peso molecular. Ambos, en sus formas activas, son sustratos de la PCA y tienen una organización esquemática lineal representada por dominios A duplicados (A1 y A2), seguidos por un dominio B, luego un dominio adicional (A3) y finalmente dominios C duplicados (C1 y C2) (Figura N° 1).

Durante la activación temprana de la coagulación sanguínea estos factores se activan a través de proteólisis por la trombina o por el factor Xa. En la parte superior de la figura N° 1 las flechas representan los sitios de clivaje de la trombina sobre el factor V, proceso requerido para que se genere el factor V activado.

La PCA degrada en forma específica los factores Va y VIIIa, pero si no han sido activados previamente por la trombina los factores V y VIII serían pobres sustratos de la PCA. La inactivación del factor Va por la PCA ocurre como consecuencia del clivaje entre los dominios A1 y A2 de la molécula, más específicamente en las posiciones de los aminoácidos 306 y 506, que están representados con las flechas en la parte inferior de la figura N° 1 (2-5).

Por su parte la PS es un cofactor sinérgico de la PCA en la medida en que en su presencia inactiva en forma más eficiente los factores Va y VIIIa. Recientemente se ha considerado que el factor V podría actuar también como cofactor sinérgico con la PS durante la inactivación del factor VIIIa por la PCA (6).

RESISTENCIA A LA PROTEÍNA C ACTIVADA DEBIDA A UNA MUTACIÓN EN EL GEN DEL FACTOR V

En febrero de 1993 Dahlback y colaboradores (7) describieron un paciente trombofílico en el que la PCA era incapaz de prolongar *in vitro* el valor de su tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa); es decir, su plasma era **resistente** a la acción de la PCA. Se introdujo entonces el concepto de resistencia a la PCA (RPCA). Este trastorno se encontró en otros miembros de la familia y en otros pacientes trombofílicos no relacionados con el caso índice. Dahlback y colaboradores supusieron la existencia

de otro cofactor de la PCA, además de la ya conocida PS, y lo llamaron tentativamente "cofactor II de la PCA" (7). En el mismo año otros grupos norteamericanos identificaron el fragmento molecular de la PCA que interactúa con el factor Va y definieron que la inactivación del factor Va por la PCA ocurre por la ruptura del factor Va en los residuos de arginina 506 y 306. Luego el grupo de Griffin encontró que hasta en la mitad de los pacientes trombofílicos está presente la RPCA, lo que fue confirmado por el grupo de Bertina en Holanda (8,9).

En octubre de 1993 se describió por primera vez que los anticoagulantes lúpicos podrían interferir en el suero con la investigación de la RPCA *in vitro* (8). En febrero de 1994 Dahlback y Hildebrand describieron que el factor V normal purificado es capaz de corregir *in vitro* la RPCA, a pesar de que las cantidades de factor V en los plasmas con RPCA sean normales e infirieron que la RPCA, en lugar de deberse a un nuevo factor antitrombótico, puede ser causada por un factor V con función procoagulante normal, pero resistente a la acción catalítica de la PCA (10).

Finalmente, el grupo de Bertina demostró que el fenotipo de la RPCA está asociado a la homo o heterocigocidad de la mutación en un punto del exón 10 del gen del factor V, en el que la sustitución de un nucleótido de guanina por uno de adenina en la posición 1.691 produce la síntesis de una molécula anómala del factor V (11). Esta mutación, llamada mutación Leiden del factor V, produce un factor V con actividad procoagulante normal pero resistente a la acción de la PCA, ya que la mutación se encuentra en el sitio de fractura del factor V por la PCA; corresponde ese cambio de nucleótido en el DNA a la sustitución de arginina en el codón 506 por glutamina en el péptido (12). Quedó así establecido que el "nuevo" factor antitrombótico era en realidad el "viejo" factor V (13). La mutación del gen del factor V, identificable por medio de técnicas de biología molecular empleando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) corresponde al genotipo de la RPCA, en tanto que la anormalidad de la prueba *in vitro* corresponde al fenotipo de la RPCA.

Esta mutación se constituye en el más prevalente de los defectos genéticos bien definidos asociados con enfermedad y descritos hasta ahora.

GENOTIPO DE LA RPCA

Más del 80% de los pacientes con formas familiares de RPCA tienen la mutación Leiden del gen del factor V; sin embargo, hay otras mutaciones en el mismo gen que pueden causar el fenotipo de RPCA. Esta mutación se presenta en el 2% de la población holandesa asintomática (11) y es 10 veces más alta que la de los otros factores genéticos conocidos con riesgo trombotico como las deficiencias heredadas de PC, PS y At-III juntas (14). En Suecia la prevalencia de la mutación puede alcanzar el 7% de la población general y en otros países se ha calculado la prevalencia del defecto en la población general en un 2-5% (15) pero en los pacientes con trombofilia la incidencia varía entre 20-50% según los criterios de selección (14,15). En mujeres embarazadas que desarrollan fenómenos tromboticos la proporción con fenotipo de RPCA llega al 60% (14,19). Recientes informes revelan que la incidencia de la mutación de Leiden es baja entre indígenas del Amazonas y población negra brasileña (25). La transmisión es autosómica dominante y el estado homocigótico tiene un riesgo 50-100 veces mayor de sufrir trombosis que la población general mientras que los heterocigóticos sufren una trombofilia menos grave, con un riesgo de trombosis 5-10 veces mayor que el de la población general. La asociación de RPCA heredada y otra condición trombotica como la deficiencia de PC, PS o la homocistinuria incrementa aún más el riesgo de trombosis (16,17,26). Esta mutación, como se dijo, constituye el más prevalente de los defectos genéticos bien definidos asociados con enfermedad y descritos hasta ahora. Su alta prevalencia en la población general sugiere presión selectiva positiva. Durante la evolución un leve estado hipercoagulable pudo haber conferido una ventaja en situaciones como el trauma y el embarazo. Los factores de riesgo de trombosis son más bien artefactos de la vida moderna y en la antigüedad era más frecuente morir por sangrado que por trombosis.

La mutación G1691A en el exón 10 se detecta mediante la pérdida de un sitio de restricción para la enzima Mnl1 (18). Inicialmente debe amplificarse el fragmento DNA que contiene la región de interés, usando la reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores (*primers*) ya descritos en la literatura

(18). Luego el DNA amplificado se digiere con la enzima Mnl1. Resultarán tres fragmentos si el paciente posee el alelo salvaje 1691G pero sólo dos si tiene el mutado, por la pérdida de un sitio de restricción. Los fragmentos deben ser separados por electroforesis en gel de agarosa y visualizados con bromuro de etidio para poderlos analizar (18).

FENOTIPO DE LA RPCA

La evaluación *in vitro* del alargamiento del TTPa en presencia de cantidades conocidas de PCA constituye la prueba funcional o el fenotipo de la RPCA (12,14,18,20-22,26). Ésta podría considerarse como la prueba tamiz para la investigación de la RPCA. En condiciones normales, la relación del TTPa en presencia de PCA sobre el TTPa sin PCA es mayor de 2.5, es decir que la PCA prolonga el TTPa. Es de anotar que existen otras condiciones adquiridas que pueden producir el fenotipo de la RPCA: La presencia de anticoagulante lúpico, las hepatopatías, la ingestión de anorexígenos y el embarazo (19). Algunos trabajos han establecido que la relación del TTPa con PCA/TTPa sin PCA debe ser mayor de 2.7 basados en los controles normales. Si la relación es de 1.6 a 2.1 se considera sugestivo de heterocigocidad para el factor V de Leiden y un valor menor de 1.6 se considera compatible con homocigocidad (26).

CORRELACIONES CLÍNICAS

Los primeros trabajos se realizaron empleando el fenotipo como tamizaje. Uno de los más representativos de una serie consecutiva de pacientes con trombosis venosa encontró que aproximadamente el 40% tenían RPCA mientras que la población control tenía un 7% (22). Estos resultados sugirieron que la RPCA no sólo es muy común en los pacientes con trombosis sino también muy prevalente en la población general. La conclusión de que la RPCA es la causa más común de trombosis ha sido confirmada por muchos otros estudios. Los trabajos que se están efectuando en la actualidad se hacen con el estudio del genotipo mediante las técnicas de biología molecular ya descritas. Uno muy significativo fue el realizado por Ridker y colaboradores (18) quienes en una cohorte grande de 14.916 hombres aparentemente sanos detectaron que la presencia de esta mutación puntual especifi-

ca en el gen del factor V estaba asociada con un riesgo aumentado de trombosis venosa, en particular primaria, con un riesgo relativo de 3.5. La prevalencia de la mutación en el subgrupo de hombres mayores de 60 años fue 25.8% con un riesgo relativo de 7. La presencia de la mutación no se asoció con riesgo aumentado de infarto de miocardio o enfermedad cerebrovascular. No se sabe bien si la RPCA causa un riesgo aumentado de trombosis arterial aunque ha habido informes que sugieren que existe alguna relación entre eventos trombóticos arteriales y RPCA. En general no hay evidencia de que las deficiencias heterocigotas de PC, PS y At-III o RPCA incrementen el riesgo de trombosis arterial.

La manifestación clínica más común es la trombosis venosa profunda de las extremidades inferiores con o sin embolismo pulmonar, que explica por lo menos el 90% de los episodios trombóticos. Sitios inusitados de trombosis venosa, como las venas cerebrales o mesentéricas, explicarían el porcentaje restante. Al contrario de lo que ocurre con las deficiencias de PC, PS y At-III, el primer episodio vaso-oclusivo tiende a ser en edad avanzada (9,18). Aunque la RPCA *per se* parece ser menos severa que las otras deficiencias, su presencia incrementa en forma marcada el riesgo de trombosis en pacientes con deficiencias de PC, PS y At-III. Debido a la alta prevalencia de RPCA en la población general su combinación con otros defectos genéticos no es excepcional (16,17,26).

Por lo menos la mitad de los episodios trombóticos venosos ocurren en asociación con factores de riesgo circunstanciales como cirugía, embarazo, inmovilización o ingesta de anovulatorios.

Se calcula que 1:5.000 individuos sean homocigotos para la RPCA. El riesgo trombótico general para ellos se estima en 11 veces más alto que el del heterocigoto y 80 veces más alto que el de los individuos normales (27).

La probabilidad de una trombosis antes de los 33 años en los homocigotos es dos veces mayor que en los heterocigotos (40% vs 20%). La tasa de recurrencia por paciente y por año después del primer episodio trombótico es de 9.5% en el homocigoto y de 5% en el heterocigoto; esta última cifra es similar a la del grupo control por lo que algunos investigadores postulan que los heterocigotos para el factor V de Leiden no son indicación de tratamiento anticoagulante oral a largo plazo como tampoco se lo recomienda para

pacientes homocigotos con un solo evento tromboembólico (24).

RECOMENDACIONES Y MANEJO

1. La investigación del fenotipo de la RPCA debe ser el paso inicial del estudio de todo paciente con trombofilia sea heredada o adquirida; la probabilidad de encontrarla es diez veces mayor que la de hallar deficiencia de PC, PS o At-III. Estos estudios no deben omitirse pues puede haber coexistencia. En conjunto permitirán establecer la causa del 50 al 70% de los casos de trombofilias familiares. En pacientes con fenotipo de RPCA deben investigarse el genotipo y la presencia de anticoagulante lúpico y anticuerpos antifosfolípidos. Es posible que los pacientes con RPCA presenten una trombofilia menos grave que la observada en otros estados de trombogénesis primaria.

2. Desde el punto de vista terapéutico Dahlback recomienda:

a. En heterocigotos sin otros defectos anticoagulantes ni historia familiar o personal de trombosis, se debe emplear profilaxis con anticoagulantes sólo en situaciones con riesgo aumentado de trombosis como cuando se someten a cirugía mayor.

b. En heterocigotos con antecedentes de episodios vaso-oclusivos recurrentes es recomendable la anticoagulación a largo plazo. Si ha habido sólo un evento trombótico la anticoagulación sería profiláctica en situaciones de riesgo.

c. En heterocigotos con alguna otra condición trombofílica asociada, o en homocigotos, es recomendable la anticoagulación profiláctica; si ya ha ocurrido algún episodio vaso-oclusivo está indicada la anticoagulación prolongada.

SUMMARY

RESISTANCE TO ACTIVATED C PROTEIN: A NEW CAUSE OF THROMBOPHILIA

Venous thromboembolism is a serious medical problem causing considerable suffering and occasional death. There are circumstantial risk factors: Surgery, immobilization, pregnancy and the use of oral contraceptives. In addition, there are genetic risk factors: Deficiencies of protein C, protein S, antithrombin III, and disfi-

brinogenemia. Recently, inherited resistance to the anticoagulant action of activated C protein was found to be a factor involved in pathogenesis. In most cases this is caused by a single point mutation in the factor V gene. The molecular basis of the mutation, the clinical manifestations, diagnostic methods and guidelines for management are described.

BIBLIOGRAFÍA

1. DE STEFANO V, FINAZZI G, MANNUCCI PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* 1996; 87: 3531-3544
2. ESMON CT: The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989; 264: 4743-4746.
3. FOSTER D, DAVIE E: Characterization of cDNA coding for human protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 4766-4770.
4. KALAFATIS M, MANN KG: Role of the membrane in the inactivation of factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* 1993; 266: 27246-27257.
5. ESMON CT: Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Haemost* 1993; 70: 29-35.
6. SHEN L, DAHLBACK B: Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem* 1994; 269: 18735-18738.
7. DAHLBACK B, CARLSSON M, SVENSSON PJ.:Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1004-1008.
8. GRIFFIN JH, EVATT B, WIDEMAN C, FERNANDEZ JA: Anticoagulant protein C pathway defective in a majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; 82: 1989-1993.
9. KOSTER T, ROSENDAAL FR, RONDE H, et al: Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden thrombophilia study. *Lancet* 1993; 342: 1503-1506.
10. DAHLBACK B, HILDEBRAND B: Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:1396-1400.
11. BERTINA RM, KOELEMAN BPC, KOSTER T, et al: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-67.
12. SUN X, EVATT B, GRIFFIN JH: Blood coagulation factor Va abnormality associated with resistance to activated protein C in venous thrombophilia. *Blood* 1994; 83: 3120-3125.
13. TUDDENHAM EGD: Thrombophilia: The new factor is old factor V. *Lancet* 1994; 343:1515-1516.
14. DAHLBACK B: Inherited thrombophilia: Resistance to activated protein C as a pathogenic factor for venous thromboembolism. *Blood* 1995; 85: 607-614.
15. MAJERUS PW: Bad blood by mutation. *Nature* 1994; 369:14-15
16. GANDRILLE S, GREENGARDJS, ALHENC-GELAS M, et al: Incidence of activated protein C resistance caused by the Arg 506 Gln mutation in factor V in 113 unrelated symptomatic protein C deficient patients. *Blood* 1995; 86: 219-224.
17. ZOLLER B, BERNTSDOTTER, GARCIA P: Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood* 1995; 85: 3518-3523.
18. RIDKER PM, HENNEKENS CH, LINDPAINTNER K, et al: 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.
19. CUMMING AM, TAIT RC, FILDES S, et al: Development of resistance to activated protein C during pregnancy. *Brit J Haematol* 1995; 90: 725-727.
20. ZOLLER B, DAHLBACK B: Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* 1994; 343: 1536-1538.
21. ROSENDAAL FR, BERTINA RM, REITSMA PH: Evaluation of activated protein C resistance in stored plasma. *Lancet* 1994; 343: 1288-1290.
22. SVENSSON PJ, DAHLBACK B : Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 300: 517-522.
23. ROSENDAAL FR, KOSTER T, VANDENBROUCKE JP, et al: High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85:1504-1508.
24. RINTELEN C, PABINGER I, KNOBL P, et al: Probability of recurrence of thrombosis in patients with and without factor V Leiden. *Thromb Haemost* 1996; 75: 229-232.
25. ARRUDA VR, von SUBEN PM, SOARES MCP, et al: Very low incidence of Arg506Gln mutation in the factor V gene among the Amazonian indians and the Brazilian black population. *Thromb Haemost* 1996; 75: 860-861.
26. MANDEL H, BRENNER B, BERANT M: Coexistence of hereditary homocystinuria and factor V Leiden -effect on thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334:763-768.