

Prevalencia de la resistencia a la Proteína C activada en poblaciones indígena y negra del occidente de Venezuela.

Gilberto Vizcaino¹, Enrique Torres¹, Jesús Quintero¹, Falko Herrmann², Rita Grimm², María Diez-Ewald¹, Melvis Arteaga-Vizcaino¹, José Luis Pérez-Requejo³ y José Colina-Araujo⁴.

¹Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela, ²Institute of Human Genetics, Greifswald, Germany y ³Banco de Sangre del Estado Carabobo, Valencia, Venezuela, ⁴Hospital General, Caja Seca, Estado Zulia, Venezuela. E-mail: g_vizcaino@hotmail.com

Palabras clave: Resistencia a la Proteína C activada, prevalencia, factor V Leiden, trombosis.

Resumen. La Resistencia a la Proteína C activada (RPCa) es el fenotipo común del Factor V Leiden (Arg506Gln) reconocido como factor de riesgo trombótico. El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de RPCa y su asociación con el Factor V Leiden en poblaciones indígena y negra del occidente de Venezuela, ya que hasta el presente no hay publicaciones sobre esta asociación en grupos étnicos venezolanos. Se estudiaron 80 indígenas de la etnia Yukpa de la Sierra de Perijá y 91 individuos de raza negra habitantes de la región sureste del Lago de Maracaibo. La RPCa fue determinada según el método de Dählback, modificado por Jorquera y col. y Trossaert y col. y los resultados se expresaron como n-PCa-SR (valor positivo $\leq 0,75$). Las muestras de sangre anticoagulada con EDTA fueron impregnadas en papel secante y procesadas para la detección del Factor V Leiden según técnicas estándar para PCR y de análisis de restricción, en el Institute of Human Genetics (Greifswald, Alemania). No se encontró diferencia significativa entre la n-PCa-SR de los indígenas ($\bar{X} \pm EE=1,13 \pm 0,02$; IC 95%= 1,07-1,19) y el de los sujetos de raza negra ($1,07 \pm 0,02$; IC 95%= 1,03-1,12). La prevalencia de RPCa fue de 1,25% (1/80) en indígenas (el caso era heterocigoto para Factor V Leiden) y 4,4% (4/91) en la raza negra (un individuo resultó ser heterocigoto para factor V Leiden). Ninguno de los pacientes con RPCa tenía antecedentes personales o familiares de trombo-
sis.

Esta investigación representa el primer informe sobre la asociación de RPCa y Factor V Leiden en aborígenes e individuos de raza negra venezolanos. Aunque entre los indígenas existe una alta endogamia no se puede descartar en ninguno de los dos grupos raciales la intervención de genes foráneos. El hallazgo de RPCa sin Factor V Leiden (Arg506Gln) sugiere la presencia de una mutación diferente en la molécula del Factor V. La determinación de la prevalencia de este fenotipo y su marcador molecular en diferentes grupos étnicos es importante para la interpretación de su papel como factores de riesgo para enfermedades trombóticas.

Prevalence of the activated protein C resistance in indians and black populations from western Venezuela

Invest Clín 2000; 41(1): 29-36.

Key words: Activated protein C resistance, prevalence, factor V Leiden, thrombosis.

Abstract. The Activated Protein C Resistance (APCR) is the common phenotype of Factor V Leiden (arg506gln), which is considered as a thrombotic risk factor. The aim of this study was to determine the prevalence of APCR and its association with Factor V Leiden in indian and black populations from Zulia State in western Venezuela. Blood samples were taken from 80 Yukpa indians from Sierra de Perijá and 91 black individuals from the southeast of Lago de Maracaibo. APCR was determined by the Dahlback's method with the modifications of Jorquera *et al.* and Trossaert *et al.* The results were expressed as n-APC-SR (positive value ≤ 0.75). Factor V Leiden genotype was identified by PCR and restriction analysis standard methods at the Institute of Human Genetics (Greifswald, Germany). No significant difference was found between n-APC-SR from indians (mean \pm SEM 1.13 ± 0.02 , CI 95%= 1.07-1.19) and black people (1.07 ± 0.02 , CI 95%= 1.03-1.12). APCR prevalence from indians was 1.25% (1 out of 80) who was heterocygous case for F V Leiden and 4.4% (4 out of 91) from blacks (one case was heterocygous for F V Leiden). No thrombotic event personal or familial was demonstrate. Our data represent the first report related to the association between APCR and F V Leiden in venezuelan indian and black individuals. APCR without the Factor V Leiden expression suggest a different type of mutation in the Factor V molecule. In spite of high endogamia in the indian group, we can not descart the role of foreign genes in both populations. The determination of the prevalence of this phenotype and its molecular marker in various ethnic groups is important for the interpretation of their role as risk factors for thrombotic disease.

Recibido: 2-11-99. Aceptado: 4-2-2000.

INTRODUCCIÓN

En 1993, Dählback y col. (1), estudiaron una familia con historia de trombosis recurrente y encontraron que la Proteína C activada no logró prolongar el Tiempo de Tromboplastina parcial como era de esperarse. Este hallazgo postuló la presencia de la Resistencia a la Proteína C activada (RPCa).

Bertina y col. (2), publicaron que la RPCa está asociada a una mutación en el gen del Factor V de la coagulación con la sustitución de guanina por adenina en la posición 1691, cambio que predice el reemplazo de arginina por ácido glutámico en la posición 506 de la cadena pesada del factor V, denominándose Factor V Leiden (3), lo que hace resistente al factor V a la ruptura por la PCa y por lo tanto continúa expresando su actividad coagulante. Se encontró que la RPCa era altamente prevalente en enfermedades tromboembólicas (20 a 60%) y diez veces más frecuente que otras entidades hereditarias que ocasionan trombosis (4). En trombofilia familiar la RPCa se encuentra en el 50% de los casos y está asociada al Factor V Leiden en el 90%; su modo de transmisión hereditaria es autosómica dominante (5).

La presencia del Factor V Leiden se ha descrito casi exclusivamente en raza caucásica, con una prevalencia entre el 2 y el 5% en la población normal. En razas africana, asiática y en aborígenes americanos su prevalencia es escasa o inexistente (6).

En el Estado Zulia del occidente de Venezuela, se encuentran zonas donde se concentran grupos étnicos como son los indígenas de la Sierra de Perijá y la raza negra en el sureste del Lago de Maracaibo, por lo que el propósito del presente estudio fue estimar la prevalencia de la RPCa en estos dos grupos de poblaciones y su asociación con el genotipo del Factor V Leiden.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 80 indígenas pertenecientes a la etnia Yukpa, descendientes de los indios Caribes, habitantes de la Sierra de Perijá y 91 individuos de raza negra de la región sudeste del Lago de Maracaibo. Cada individuo fue interrogado acerca de antecedentes personales o familiares de enfermedades tromboembólicas.

La determinación de la RPCa fue realizada midiendo el Tiempo de tromboplastina parcial (TTP) siguiendo el método de Dählback y col. (1), con las modificaciones hechas por Jorquera y col. (7) y Trossaert y col.(8), mediante la adición de plasma deficiente de Factor V y dilución 1:5 (tampón tris salina, 0,1% albúmina bovina, ph 7,4) de plasmas de los sujetos y de una mezcla de plasmas normales. La concentración utilizada de la PCa (Diagnóstica Stago, Asnieres, Francia) fue de 1 ug/mL en ClCa^{2+} 0,025M.

Los resultados fueron expresados en función de la razón normalizada (n-PCa-SR) al dividir la razón del plasma problema (TTP con PCa entre TTP sin PCa) sobre la razón de

una mezcla de plasmas normales. Se consideró como RPCa presente, un valor igual o menor a 0,75 (9).

Para la determinación del genotipo del Factor V Leiden se colocaron las muestras de sangre periférica anticoagulada con EDTA sobre papel secante y se enviaron al Institute of Human Genetics (Greifswald, Alemania) para su procesamiento (6) y detección del marcador molecular por métodos estándar de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de restricción (2).

El análisis estadístico consistió en el cálculo de frecuencias y de probabilidad, esta última mediante la t de Student para una significación de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los valores promedio \pm error estándar de la RPCa fueron $1,13 \pm 0,02$; IC 95% = 1,07-1,19 en los indígenas y $1,07 \pm 0,02$; IC 95% = 1,03-1,12 en los negros sin diferencia estadísticamente significativa (Tabla I).

La prevalencia de la RPCa, en el grupo indígena fue de 1,25% (1/80) y se encontró que éste individuo era heterocigoto para el Factor V Leiden. Cuatro sujetos de raza negra presentaron RPCa para una prevalencia de 4,4% (4/91) y sólo uno de ellos estaba asociado con la forma heterocigota del Factor V Leiden. Es de hacer notar que todos los individuos de raza negra con RPCa eran de sexo femenino. En ninguno de los casos positivos se obtuvo el antecedente personal o familiar de enfermedad tromboembólica.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se describen los primeros casos de asociación de RPCa y Factor V Leiden en aborígenes y en individuos de raza negra venezolanos. No obstante, su prevalencia es menor que los grupos étnicos caucásicos lo que habla a favor del origen europeo de esta mutación y su diseminación por migración (6) (Tablas II y III). En este trabajo se halló un indígena con RPCa

TABLA I
RESISTENCIA A LA PROTEÍNA C ACTIVADA EN INDÍGENAS YUKPA
Y EN NEGROS DEL ESTADO ZULIA, VENEZUELA

GRUPO	n-Pca-SR* ($\bar{X} \pm EE$)	n-Pca-SR <0,75	PREVALENCIA DE RPCa (%)	FACTOR V LEIDEN
Indígenas (80)	$1,13 \pm 0,02$	0,74	1,25 (1)	1
Negros (91)	$1,07 \pm 0,02$	0,72 0,73 0,74 0,73	4,4 (4)	1

() número de casos

* Razón normalizada de los tiempos del TTP con y sin PCa.

TABLA II
PREVALENCIA EN DIFERENTES POBLACIONES DE LA RPCa/FACTOR V LEIDEN

POBLACIÓN	PAÍS	AUTOR (ref)	PREVALEN. (%)	OBSERVACIONES
Arabes	Jordania	Awidi y col. (16)	12,25	
Griegos	Grecia	Antoniadi y col. (17)	2,5	
Afroamericanos	Estados Unidos	Mack y col. (18)	5,8	
Espanoles	España	Altés y col. (19)	2,0	Mujeres
Ingleses	Gran Bretaña	Lowe y col. (20)	2,5	
Norteamericanos	Estados Unidos	Brandt y col. (12)	4,1	Niños
Holandeses	Holanda	Heijmans y col. (21)	4,7 y 5,0	>85 y 18-40 años
Afroamericanos	Estados Unidos	Rose y col. (22)	0,4	Mujeres
Espanoles	España	Sánchez y col. (23)	4,5	

TABLA III
ESTUDIOS MULTIÉTNICOS DE PREVALENCIA DE LA RPCa/FACTOR V LEIDEN

POBLACIONES	AUTOR (ref)	PREVALENCIA (%)
Hispano-Americanos	Gregg y col.(24)	1,65
Afro-Americanos		0,87
Asiático-Americanos		0
Nativo-Americanos		0
Caucásico-Americanos	Ridker y col.(14)	5,27
Hispano-Americanos		2,21
Afro-Americanos		1,23
Asiático-Americanos		0,45
Nativo-Americanos		1,25
Europeos (Italianos y Españoles)	Pepe y col.(25)	2,94
Sahara-Africanos		0
Asiáticos		0,86
Amerindios		0
Afro-Americanos		0
Etiopes		
Alemanes	Herrmann y col.(6)	7,0
Polacos		5,0
Argentinos		5,1
Venezolanos		1,6
Costarricenses		2,0
Hindúes		1,3

asociada a la forma heterocigota del factor V Leiden y un individuo de raza negra de los cuatro con RPCA donde también se encontró esta asociación.

Una probable explicación a este hallazgo, es que a pesar que en los indígenas Yukpa existe un alto grado de endogamia por ser comunidades cerradas, no es posible descartar la intervención de genes foráneos, al igual que en los individuos de raza negra entre los cuales la endogamia es menor.

No puede descartarse la posibilidad de que en los casos descritos de RPCa sin F V Leiden, exista otro tipo de mutación, como sucede con los casos del Factor V Cambridge (Arg306Thr) descrito por Williamson y col. en 1998 (10) y del Factor V Hong Kong (Arg306Gly) descrito por Chan y col. (11).

El estudio fenotípico del Factor V Leiden mediante la prueba de la RPCa es de gran utilidad para analizar la prevalencia en diferentes grupos étnicos porque permite estudiar poblaciones a un relativo bajo costo. Las modificaciones realizadas a esta prueba han aumentado su sensibilidad y reproductibilidad a un 98% (7,8,12) y según las recomendaciones de Aznar (13) esta metodología se convierte en un instrumento confiable para el diagnóstico de laboratorio de trombosis asociada a RPCa hereditaria o adquirida. La prueba de la RPCa debe ser una exploración obligatoria en pacientes de raza caucásica con eventos trombóticos de causa no determinada o en aquellos individuos donde exista recurrencia

de estos eventos o en quienes el hallazgo de antecedentes familiares estén presentes (14,15).

Es importante el conocimiento de la prevalencia del F V Leiden como marcador molecular y su fenotipo en diferentes grupos étnicos para la interpretación de su relevancia como factores de riesgo para enfermedades trombóticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DAHLBACK B., CARLSSON M., SVENSSON P.J.: 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.
2. BERTINA R.M., KOELEMAN B.P.C., KOSTER T., ROSENDAAL F.R., DIRVEN R.J., DE RONDE H., VANDERVELDEN P.A., REITSMA P.H.: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 1994, 359: 64-68.
3. KOSTER T., ROSENDAAL F.R., DE RONDE H., BRIET E., VANDERBROUCKE J.P., BERTINA R.M.: Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C. Leiden thrombophilia Study. Lancet 1993, 342:1503-1506.
4. DAHLBACK B.: Inherit thrombophilia: resistance to activated protein C as a polygenic factor

- of venous thromboembolism. *Blood* 1995, 85:607-614.
5. SAMAHA M., TROSSAERT H., CONARD J., HORELLOU M.H., ELALAMY I., SAMAMA M.: Prevalence and patient profile in activated protein C resistance. *Am J Clin Pathol* 1995, 104:450-454.
 6. HERRMANN F.H., KOESLING M., SCHRODER W., ALTMAN R., JIMÉNEZ R., LOPACIUK S., PÉREZ-REQUEJO J.L., SINGH J.R.: Prevalence of Factor V Leiden in various populations. *Genetic Epidemiol* 1997, 14: 403-411.
 7. JORQUERA J.L., MONTORO J.M., FERNÁNDEZ M.A., AZNAR L.A., AZNAR J.: Modified test for Activated protein C Resistance. *Lancet* 1994, 344: 1162-1163.
 8. TROSSAERT M., CONARD J., HORELLOU M.H., SAMAMA M.M., IRELAND H., BOYSTON T.A., LANE D.A.: Modified APC resistance assay for patients on oral anticoagulant. *Lancet* 1994, 1709.
 9. De Ronde H, Bertina RM. Laboratory diagnosis of APC-resistance: a critical evaluation of the test and the development of diagnostic criteria. *Thromb Haemostas* 1994, 72:880-886.
 10. WILLIAMSON D., BROWN K., LUDDINGTONR, BAGLIN C., BAGLIN T.: Factor V Cambridge: a new mutation (arg 306thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood* 1998, 91:1140-1144.
 11. CHAN W.P., LEE C.K., KWONG Y.L., LAM C.K., LIANG R.: A novel mutation of arg306 of Factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood* 1998, 91: 1135-1139.
 12. BRANDT T.G., GRUPPO R., GLUECK C.J., STROOP D., BECKER A., PILLOW A., WANG P.: Sensitivity, specificity, and predictive value of modified assays for activated protein C resistance in children. *Thromb Haemost* 1998, 79:567-570.
 13. AZNAR J. Diagnóstico biológico de la Resistencia a la Proteína C. XVI Congreso Internacional de Hemostasis y Trombosis. 1999, Lima, Perú.
 14. RIDKER P.M., MILETICH J.P., HENNEKENS C.H., BENING J.E.: Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women, Implications for venous thromboembolism screening. *JAMA* 1997, 277:1305-1307.
 15. DE STEFANO, CHIUSOLO P., PACIARONI K., LEONE G.: Epidemiology of factor V Leiden: clinical implications. *Semin Thromb Hemost* 1998, 24:367-379.
 16. AWIDI A., SHANNAK M., BSEISO A., KAILANI MA, OMAR N., ANSHASI B., SAKARNEH N.: High prevalence of factor V Leiden in healthy Jordanian Arabs. *Thromb Haemost* 1999, 81:582-584.
 17. ANTONIADI T., HATZIS T., KROUPIS C., ECONOMON PETERSEN E., PETERSEN M.B.: Prevalence of factor V Leiden,

- protrombin G20210A, and MTHFR c677T mutations in a Greek population of blood donors. *Am J Hematol* 1999, 61:265-267.
18. MACK R., SAMAAAN P., PODOLAK I., ALBANESE E.: Prevalence of factor V Leiden in African-Americans. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1998, 99:339-343.
19. ALTÉS A., SOUTO J.C., MATEO J., BORRELL M., FONTCUBERTA J.: Activated protein C resistance assay when applied in the general population, *Am J Obstet Gynecol* 1997, 176: 358-359.
20. LOWE G.D., RUMLEY A., WOODWARD M., REID E., RUMLEY J.: Activated protein C resistance and the factor V:r506Q mutation in a random population sample-associations with cardiovascular risk factors and coagulation variables. *Thromb Haemost* 1999, 81: 918-924.
21. HEIJMANS B.T., WESTERDORP R.G., KNOOK D.L., KLUFT C., SLAGBOOM P.E.: The risk of mortality and the factor V Leiden mutation in a population-based cohort. *Thromb Haemost* 1998, 80: 607-609.
22. ROSE N.C., WANG Y.L., NEUBERT A.G., ROTH N.W., WILSON R.B.: An evaluation of the factor V Leiden mutation in a cohort of African-American pregnant women. *Prenat Diag* 1998, 18:315-317.
23. SÁNCHEZ J., ROMÁN J., DE LA TORRE M.J., VELASCO E., TORRES A.: Low prevalence of the factor V Leiden among patients with ischemic stroke. *Haemostasis* 1997, 27:9-15.
24. GREGG J.P., YAMANE A.J., GRODY W.W.: Prevalence of the factor V Leiden mutation in four distinct american ethnic populations, *Am J Med Genet* 1997, 73:334-336.
25. PEPE G., RICKARDS O., VANE-GAS O.C., BRUNELLI T., GORI A.M., GIUSTI B., ATTANASIO M., PRISCO D., GENSINI G.F., ABBATE R.: Prevalence of factor V Leiden mutation in non-european populations. *Thromb Haemost* 1997, 77:329-331.