



## Trombofilia genética y marcadores de activación endotelial en pacientes con preeclampsia

Julio C Rojas,\* Martha Luna,\*\* Hugo Rangel-Nava,\*\* Dolores Baños,\* María T Collados\*,\*\*\*

Nivel de evidencia: II-3

### RESUMEN

**Antecedentes:** la coexistencia constante de trombosis en pacientes con preeclampsia sugiere que la función del endotelio podría ser un mediador determinante en su patogénesis.

**Objetivo:** determinar la asociación entre marcadores de trombofilia genética, activación endotelial y preeclampsia.

**Material y método:** estudio prospectivo de casos y controles para determinar la existencia del factor V de Leiden, protrombina G20210A y metilentetrahidrofolato reductasa C677T, resistencia a la proteína C activada y concentraciones séricas del factor de von Willebrand, receptor sFlt1 en mujeres con preeclampsia ( $n = 28$ ) y comparar esos valores con los de pacientes embarazadas sanas ( $n = 41$ ).

**Resultados:** se observó una alta frecuencia alélica de la metilentetrahidrofolato reductasa C677T (0.50). Aun en ausencia del factor V de Leiden se observaron diferencias notables en la prevalencia de resistencia a la proteína C activada y de concentraciones anormales de sFlt1 entre el grupo de pacientes con preeclampsia homocigotas para el alelo C677T y las controles (72 vs 10%,  $p < 0.008$  y 63.6 vs 10%,  $p < 0.05$ , respectivamente). Las mujeres con dos o más pruebas anormales, incluida la homocigocidad para el alelo C677T, tuvieron un riesgo mayor de padecer preeclampsia que las que tuvieron una o ninguna (RM: 3.15; IC: 1.1-9.02).

**Conclusión:** el polimorfismo C677T del gen de metilentetrahidrofolato reductasa tiene una alta prevalencia y se asocia con marcadores de trombosis y activación endotelial en mujeres mexicanas con preeclampsia.

**Palabras clave:** preeclampsia, trombofilia genética, metilentetrahidrofolato reductasa, activación endotelial, resistencia a la proteína C activada.

### ABSTRACT

**Background:** The presence of thrombosis in preeclampsia suggests that endothelial function could play an important role in its pathogenesis.

**Objective:** Determine the association between markers of genetic thrombophilia, endothelial activation and preeclampsia.

**Material and method:** Prospective study of cases and controls to determine the factor V Leiden existence, protrombin G20210A, methylenetetrahydrofolate reductase C677T, activated protein C resistance and levels of von Willebrand factor and the sFlt1 receptor were determined in 28 women with preeclampsia and 41 pregnant controls.

**Results:** Methylenetetrahydrofolate reductase C677T had a high allelic frequency (0.50). Even in the absence of factor V Leiden, there were significant differences in the prevalence of activated protein C resistance and abnormal levels of sFlt1 between patients with preeclampsia homozygous for methylenetetrahydrofolate reductase C677T and controls (72 vs. 10%,  $p < 0.008$  and 63.6 vs. 10%,  $p < 0.05$ , respectively). Patients with two or more abnormal tests, including homozygosity for the C677T allele had an increased risk of preeclampsia than those with one or no abnormal test (OR: 3.15; CI: 1.1-9.02).

**Conclusion:** Methylenetetrahydrofolate reductase C677T has a high allelic prevalence and is associated with markers of thrombosis and endothelial activation in Mexican women with preeclampsia.

**Key words:** preeclampsia, genetic thrombophilia, metilentetrahydrofolate reductase, endothelial activation, active Protein C reactive.

### RÉSUMÉ

**Antécédents:** la coexistence constante de thrombose chez des patientes avec pré-éclampsie suggère que la fonction de l'endothélium pourrait être un médiateur déterminant dans sa pathogénèse.

**Objetivo:** déterminer l'association entre marqueurs de thrombophilie génétique, activation endothéliale et pré-éclampsie.

**Matériel et méthode:** étude prospective de cas et contrôles pour déterminer l'existence du facteur V de Leiden, prothrombine G20210A et methyl-tetra-hydrofolate réductase C677T, résistance à la protéine C activée et concentrations sériques du facteur de von Willebrand, récepteur sFlt1 chez des femmes avec pré-éclampsie (n = 28) et comparer ces valeurs avec celles des patientes en état de grossesse saines (n = 41).

**Résultats:** on a observé une haute fréquence allélique de la methyl-tetra-hydrofolate réductase C677T (0.50). Même dans l'absence du facteur V de Leiden on a observé des différences remarquables dans la prévalence de résistance à la protéine C activée et de concentrations anormales de sFlt1 entre le groupe de patientes avec pré-éclampsie homozygotes pour l'allèle C677T et les contrôles (72 vs 10%,  $p < 0.008$  et 63.6 vs 10%,  $p < 0.05$ , respectivement). Les femmes avec deux ou plus tests anormaux, l'homozygotie pour l'allèle C677T incluse, ont eu un risque majeur de souffrir pré-éclampsie que celles qui ont eu un ou aucun (RM: 3.15; IC: 1.1-9.02).

**Conclusion:** le polymorphisme C677T du gène de methyl-tetra-hydrofolate réductase a une haute prévalence et est associé avec des marqueurs de thrombose et activation endothéliale chez des femmes mexicaines avec pré-éclampsie.

**Mots-clés:** pré-éclampsie, thrombophilie génétique, methyl-tetra-hydrofolate réductase, activation endothéliale, résistance à la protéine C activée.

## RESUMO

**Antecedentes:** A coexistência constante de trombose em pacientes com pré-eclâmpsia sugere que a função do endotélio poderia ser um mediador determinante em sua patogênese.

**Objetivo:** Determinar a associação de marcadores de trombofilia genética, ativação endotelial e pré-eclâmpsia.

**Material e método:** Estudo prospectivo de casos e controles para determinar do fator V de Leiden, protrombina G20210A e metilente-tetrahidrofolato reductasa C677T, resistência a proteína C ativada e concentrações séricas do fator de Von Willebrand, receptor sFlt1 em mulheres com pré-eclâmpsia (n = 28) e comparar esses valores com os de pacientes grávidas saudáveis (n = 41).

**Resultados:** Foi observada uma alta frequência alélica das metilente-tetrahidrofolato reductasa C677T (0,50). Mesmo em ausência do fator V de Leiden se observaram diferenças notáveis na prevalência de resistência a proteína C ativada e de concentrações anormais de sFlt1 entre o grupo de pacientes com pré-eclâmpsia homocigotas para o alelo C677T e nos controles (72 vs 10%,  $p < 0,05$ , respectivamente). As mulheres com dois ou mais exames anormais, incluída a homocigocidade para o alelo C77T, tiveram um risco maior de padecer de pré-eclâmpsia do que as mulheres que tiveram uma ou nenhuma (RM: 3,15; IC: 1,1-9,02).

**Conclusão:** O polimorfismo C677T dos genes de metilente-tetrahidrofolato tem uma alta prevalência e se associa com marcadores de trombose e ativação endotelial em mulheres mexicanas com pré-eclâmpsia.

**Palavras chave:** Pré-eclâmpsia, trombofilia genética, metilente-tetrahidrofolato reductasa, ativação endotelial, resistência a proteína C ativada.

La preeclampsia es una complicación obstétrica de causa incierta, caracterizada por una respuesta inflamatoria sistémica e insuficiencia orgánica múltiple que afecta la placenta, el hígado y el sistema nervioso central. Los estudios histopatológicos han demostrado que la trombosis de la vasculatura placentaria es un hallazgo constante en la preeclampsia y las concentraciones elevadas de ciertos marcadores séricos evidencian

la naturaleza sistémica de la enfermedad, con activación endotelial generalizada en las pacientes afectadas.<sup>1</sup>

En las últimas dos décadas, los polimorfismos genéticos, considerados factores de riesgo de trombosis, incluido el factor V de Leiden, asociado con resistencia a la proteína C activada, la protrombina G20210A y la metilente-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) han recibido atención por su posible importancia como factores de

\* Centro de Investigación y Extensión en Ciencias de la Salud.

\*\* Departamento de Ginecología y Obstetricia, Hospital San José.

\*\*\* Centro de Biotecnología. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Monterrey, Nuevo León, México.

Correo electrónico: julio.rojas@mail.utexas.edu  
Recibido: febrero, 2010. Aprobado: julio, 2010.

Este artículo debe citarse como: Rojas JC, Luna M, Rangel-Nava H, Baños D, Collados MT. Trombofilia genética y marcadores de activación endotelial en pacientes con preeclampsia. Ginecol Obstet Mex 2010;78(8):401-409.

Correspondencia: Dr. Julio C Rojas, Departamento de Psicología, Universidad de Texas, Austin 78712, Texas, Estados Unidos.

[www.nietoeditores.com.mx](http://www.nietoeditores.com.mx)

riesgo de preeclampsia y varios estudios han demostrado una fuerte asociación entre dichos polimorfismos y la enfermedad.<sup>2</sup> Otros estudios, sin embargo, han arrojado resultados contradictorios, y cuando la asociación entre trombofilia genética y preeclampsia coexiste, ésta es modesta. Por ello, la importancia patogénica de la trombofilia genética en pacientes con preeclampsia sigue siendo incierta, especialmente ante la evidencia que indica que el perfil étnico de las pacientes afecta de manera importante esta asociación.

La resistencia a la proteína C activada es el fenotipo clásico del factor V de Leiden y representa la causa hereditaria más común de trombosis en la población blanca. Sin embargo, 5 a 10% de los casos de resistencia a la proteína C activada tienen una causa distinta al factor V de Leiden y, hasta la fecha, no se ha caracterizado. Está demostrado que la resistencia a la proteína C activada adquirida es un evento común del embarazo, especialmente después de la semana 20 de gestación y es aún más común en las pacientes con preeclampsia o pérdida fetal en el segundo trimestre.<sup>3</sup> Estas observaciones sugieren la existencia de un factor protrombótico que regula la función endotelial y promueve un estado transitorio de resistencia a la proteína C activada.

El endotelio, especialmente el de la vasculatura placentaria, parece jugar un papel central en la respuesta inflamatoria sistémica característica de la preeclampsia. El factor de von Willebrand es una glucoproteína secretada al torrente sanguíneo por el endotelio que ha sido activado por estímulos físicos, químicos o metabólicos. El factor de von Willebrand es un marcador no específico de activación endotelial y se encuentra elevado en pacientes con preeclampsia, en comparación con mujeres con embarazos normales, lo cual sugiere la existencia de un factor que activa el endotelio y que es más prominente en mujeres con preeclampsia. Finalmente, el descubrimiento de concentraciones elevadas de la porción soluble del receptor de tirosina cinasa parecido a *fms* (sFlt1), un antagonista del factor de crecimiento vascular endotelial en mujeres con preeclampsia, ha originado la hipótesis de que la inhibición del proceso fisiológico de vasculogénesis podría representar una alteración endotelial patogénicamente relevante en mujeres con preeclampsia.<sup>4</sup>

Para estudiar la relación entre estos factores, el objetivo de este estudio es determinar la asociación entre los polimorfismos trombofílicos del factor V de Leiden,

protrombina G20210A y metilentetrahidrofolato reductasa C677T y preeclampsia en relación con las concentraciones séricas maternas de marcadores de estimulación endotelial.

## MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo de casos y controles efectuado en el Hospital de Ginecología y Obstetricia Garza-García de Monterrey, Nuevo León, de enero a diciembre de 2002, con mujeres mexicanas de tercera generación. Las pacientes se reclutaron durante su admisión para atención del trabajo de parto o control de su enfermedad.

Se asignaron al grupo con preeclampsia si: 1) tenían más de 20 semanas de gestación, 2) si la presión arterial sistémica era  $\geq 140/90$  mmHg en dos mediciones obtenidas con un intervalo de al menos cuatro horas, y 3) si tenían  $\geq 300$  mg de proteína en orina de 24 horas. Se diagnosticó preeclampsia severa en las pacientes que cumplieron con al menos uno de los siguientes criterios: 1) hipertensión  $> 160/110$  mmHg, 2) proteinuria  $> 5$  g/24 horas, 3) pruebas de función hepática anormales, 4) signos de retraso en el crecimiento intrauterino u oligohidramnios, 5) oliguria  $< 500$  mL/24 horas, 6) edema pulmonar, 7) trombocitopenia  $< 100 \times 10^3$  plaquetas/mm<sup>3</sup>, 8) dolor abdominal en el cuadrante superior derecho, 9) hemólisis (bilirrubina sérica total  $> 1.2$  mg/dL o esquistocitos en un frotis de sangre periférica), 10) hiperreflexia osteotendinosa, 11) síntomas de vasoespasmo (cefalea, alteración del estado de conciencia, escotomas o tinitus) o 12) convulsiones.

Se excluyeron del estudio las mujeres con hipertensión esencial, nefropatía, diabetes, enfermedades autoinmunitarias, prótesis valvulares cardíacas, fibrilación auricular o historia familiar de enfermedad autoinmunitaria. Para el grupo control, se reclutaron pacientes: 1) con embarazo a término sin complicaciones, y 2) que hubiesen sido admitidas al hospital durante el mismo día que una paciente con preeclampsia. Los criterios de no inclusión en los controles incluyeron: 1) antecedentes de preeclampsia, aborto, o pérdida fetal recurrente y trombosis, 2) embarazo actual con hipertensión o diabetes gestacional o 3) historia familiar de trombosis antes de los 45 años de edad.

Las pacientes estudiadas se valoraron mediante la historia clínica y la exploración física completas. Los expedientes médicos se revisaron para la recolección de

información clínica y de laboratorio relevante. Todas las pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito y todas las muestras biológicas se rotularon con códigos para su anonimato. Este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Centro de Investigación y Extensión en Ciencias de la Salud del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.

Se incluyeron en el estudio 46 pacientes con preeclampsia y 56 controles, durante el periodo de observación. De éstas, se excluyeron 18 pacientes con preeclampsia y 15 controles debido a la coexistencia de criterios de exclusión. El análisis final utilizó la información de 28 pacientes con preeclampsia y 41 controles. Ambos grupos fueron similares en edad, paridad, valores de citometría hemática, peso y talla del recién nacido e ingestión de suplementos con ácido fólico. Las pacientes con preeclampsia tuvieron conteos plaquetarios e hijos con menor edad gestacional que los controles (Cuadro 1).

Ocho pacientes (20%) se diagnosticaron con preeclampsia leve, 31 (77.5%) con preeclampsia severa y una (2.5%) con eclampsia. Las pacientes se reclutaron de un hospital de especialidad regional, con una alta tasa de referencia de casos complicados, la mayoría de condición socioeconómica baja. Estos factores explican la alta prevalencia de preeclampsia severa en este estudio, lo cual no refleja la prevalencia en la población general. Los criterios de severidad más comunes fueron: vasoespasmo (33.3%) y trombocitopenia (33.3%), seguidos por presión arterial > 160/110 mmHg (31.1%), hiperreflexia osteotendinosa

(28.8%), proteinuria > 5 g/24 horas (13.3%), disfunción hepática (6.6%), hemólisis (4.4%) y retraso en el crecimiento intrauterino (4.4%).

#### Detección de polimorfismos asociados con trombofilia

Las muestras de sangre venosa (10 mL) se obtuvieron por punción antecubital en un lapso de 24 horas previas al parto. Las muestras se almacenaron en tubos con ácido etilendiaminotetraacético al 2% para la extracción de ácido desoxirribonucleico o en tubos con 0.129 mL de citrato de sodio para su centrifugación a 2500 rpm durante diez minutos a 4 °C, seguida de separación de plasma. Se extrajo el ADN leucocitario mediante el método de fenol-cloroformo después de digestión con proteinasa K. El análisis genético consistió en la detección de polimorfismos por longitud de fragmentos de restricción para factor V de Leiden (G1691A), protrombina G20210A y metilentetrahidrofolato reductasa C677T, como ya fue descrito.<sup>2</sup> Los productos de la digestión se separaron en geles de agarosa al 3.5% y se visualizaron con tinción con bromuro de etidio.

#### Determinación de la resistencia a la proteína C activada

La resistencia a la proteína C activada se determinó en muestras de plasma a partir de una proporción del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) en presencia o ausencia de una cantidad estandarizada de proteína

**Cuadro 1.** Variables demográficas

	Controles	Preeclampsia	Valor p
<b>VARIABLES MATERNAS</b>			
Edad (años) ( $\mu$ , DE)	22 $\pm$ 6	24 $\pm$ 7	0.91
Paridad media (rango intercuartil)	2 (0-4)	1 (0-2)	0.41
Suplementación con ácido fólico* (%)	24	17	0.44
Leucocitos ( $\times 10^3$ /mL) ( $\mu$ , DE)	9.9 $\pm$ 2	10.5 $\pm$ 3	0.5
Hemoglobina (g/dL) ( $\mu$ , DE)	11.5 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1.5	0.22
Plaquetas ( $\times 10^3$ /mL) ( $\mu$ , DE)	214.6 $\pm$ 45	175.5 $\pm$ 55	0.04
<b>VARIABLES DEL PRODUCTO</b>			
Edad gestacional (semanas) ( $\mu$ , DE)	40.5 $\pm$ 4	37.7 $\pm$ 2	0.04
Peso (g) ( $\mu$ , DE)	3,303 $\pm$ 397	3,194 $\pm$ 585	0.35
Talla (cm) ( $\mu$ , DE)	51.3 $\pm$ 2	50.8 $\pm$ 4	0.57

$\mu$ : promedio; DE: desviación estándar.

\* 400 mg por día durante al menos el primer trimestre del embarazo.

C activada (PCA) en un coagulómetro semiautomático (ACL3000, Instrumentation Laboratory). En esta prueba, el plasma suplementado con proteína C activada debe tener un aumento en el tiempo de tromboplastina parcial activada, mientras que la ausencia de proteína C activada debe mostrar disminución del tiempo de tromboplastina parcial activada. Dicho de otra manera, la proporción tiempo de tromboplastina parcial activada + PCA/TTPa es más baja si la actividad de la proteína C activada está disminuida. Los valores anormales (prueba positiva) de resistencia a la proteína C activada tuvieron dos desviaciones estándar por debajo del valor de resistencia a la proteína C activada promedio en un concentrado de plasma obtenido de pacientes embarazadas sanas (edad gestacional > 37 semanas). La resistencia a la proteína C activada se consideró positiva si la razón TTPa + PCA / TTPa era < 1.65.

#### Concentraciones de factor de von Willebrand y sFlt1

Las concentraciones en plasma del antígeno de von Willebrand y de sFlt1 se determinaron mediante pruebas de ELISA (Corgenix, R&D Systems, respectivamente). Los puntos de corte para valores anormales se basaron en reportes de concentraciones de factor de von Willebrand y sFlt1 en el tercer trimestre del embarazo (160% y 8.1 ng/dL, respectivamente). Las pruebas se realizaron por duplicado y en relación con curvas estándar obtenidas a partir de un concentrado de plasma de mujeres embarazadas sanas (edad gestacional mayor de 37 semanas).

#### Análisis estadístico

La prevalencia de los polimorfismos estudiados se determinó mediante conteo simple de genes. Las variables demográficas se compararon mediante la prueba *t* de Student, bidireccional para muestras independientes. Las diferencias en las concentraciones de marcadores de activación endotelial se analizaron con: valores promedio y prevalencia de valores anormales. Los niveles promedio de resistencia a la proteína C activada, factor de von Willebrand y sFlt1 se compararon mediante análisis de varianza con corrección de Bonferroni. Las diferencias en las prevalencias genotípicas y de pruebas de activación endotelial anormales se analizaron con la prueba de la  $\chi^2$  de Pearson o la prueba exacta de Fisher. Todas las pruebas estadísticas se procesaron con el programa SPSS, versión 11.5 para Windows. Un valor  $p < 0.05$  se consideró significativo en todas las pruebas.

## RESULTADOS

### Polimorfismos asociados con trombofilia

En el grupo control dos mujeres tenían factor V de Leiden y en el grupo con preeclampsia una paciente tuvo protrombina G20210A (frecuencia alélica total de 0.02 y 0.01, respectivamente). En contraste, la frecuencia alélica total de metilentetrahidrofolato reductasa C677T fue 50. La homocigocidad (T/T) para este polimorfismo se detectó en 30.4% de la muestra y la heterocigocidad (T/C) en 41.1%. No hubo diferencias en la prevalencia de metilentetrahidrofolato reductasa C677T entre pacientes con preeclampsia y controles (Cuadro 2). Dada la baja prevalencia de factor V de Leiden y protrombina G20210A, en contraste con la alta prevalencia de metilentetrahidrofolato reductasa C677T, sólo este último polimorfismo se tomó en cuenta en análisis subsecuentes. Tampoco se observaron diferencias entre pacientes con preeclampsia leve y severa en términos de factores de marcadores de trombofilia genética o activación endotelial.

**Cuadro 2.** Prevalencia del genotipo de metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

MTHFR C677T	Controles % (n)	Preeclampsia % (n)	Valor <i>p</i>
Negativo (C/C)	29.2 (12)	28.5 (8)	1
Heterocigoto	46.3 (19)	32.1 (9)	0.31
Homocigoto (T/T)	24.3 (10)	39.2 (11)	0.28
Total	100 (41)	100 (28)	

C/C = homocigoto normal, T/T homocigoto C677T.

### Resistencia a la proteína C activada

Se observó una notable influencia del genotipo para metilentetrahidrofolato reductasa en los niveles promedio y la prevalencia de resistencia a la proteína C activada en las pacientes con preeclampsia. Las pacientes homocigotas con preeclampsia tuvieron un nivel promedio de resistencia a la proteína C activada mayor que las pacientes heterocigotas o negativas en el mismo grupo ( $p < 0.001$ ), mientras que este efecto del genotipo no se apreció en el grupo control ( $p = 0.61$ ) (Cuadro 3). Además, los valores promedio de resistencia a la proteína C activada en las pacientes con preeclampsia homocigotas para metilentetrahidrofolato reductasa C677T tuvieron una marcada tendencia a ser

menores que los de los controles homocigotos. Así mismo, la homocigocidad para metilentetrahidrofolato reductasa C677T se asoció con una alta prevalencia de concentraciones anormales de resistencia a la proteína C activada, únicamente en el grupo de pacientes con preeclampsia, pero no en el grupo control (Cuadro 4).

#### Concentraciones de factor de von Willebrand y sFlt1

La preeclampsia se asoció con una alta incidencia de concentraciones anormalmente elevadas de factor de von Willebrand en comparación con los controles (Cuadro 4). La prevalencia general de valores de factor de von Willebrand anormales fue influida por el genotipo para

**Cuadro 3.** Diferencias en las concentraciones séricas promedio de marcadores de activación endotelial

<i>Genotipo metilentetrahidrofolato reductasa</i>	<i>Control Mean ± SEM</i>	<i>Preeclampsia Mean ± SEM</i>	<i>Valor p</i>
Resistencia a la proteína C activada			
Homocigoto normal	2 ± 2.11	2.33 ± 0.16	0.13
Heterocigoto	1.94 ± 0.08	2 ± 0.02	0.60
Homocigoto C677T	1.87 ± 0.09	1.66 ± 0.05*	0.06
Total	1.95 ± 0.05	1.96 ± 0.07	0.88
Factor de von Willebrand (%)			
Homocigoto normal	159 ± 31	429 ± 213	0.14
Heterocigoto	324 ± 143	381 ± 179	0.81
Homocigoto C677T	480 ± 158	633 ± 187	0.54
Total	314 ± 78	494 ± 109	0.17
Receptor soluble del factor de crecimiento vascular endotelial (ng/dL)			
Homocigoto normal	7 ± 0.5	7.4 ± 2	0.83
Heterocigoto	6.7 ± 0.3	10.4 ± 3	0.17
Homocigoto C677T	6 ± 0.8	8 ± 1	0.34
Total	5.7 ± 0.3	8.7 ± 1	0.02

\* Significativamente diferente que el genotipo homocigoto normal (C/C) en el mismo grupo.

**Cuadro 4.** Diferencias en la prevalencia de valores anormales de marcadores séricos de activación endotelial

<i>Genotipo metilentetrahidrofolato reductasa</i>	<i>Control % (n)</i>	<i>Preeclampsia % (n)</i>	<i>Valor p</i>
Resistencia a la proteína C activada			
Homocigoto normal	16.6 (2)	0	0.49
Heterocigoto	26.3 (5)	0	0.14
Homocigoto C677T	10 (1)	72.7 (8)*	0.008
Total	19.5 (8)	17.8 (5)	1
Factor de von Willebrand (%)			
Homocigoto normal	25 (3)	50 (4)	0.35
Heterocigoto	21 (4)	55.5 (5)	0.09
Homocigoto C677T	70 (7)	81.8 (9)	0.63
Total	34.1 (14)	64.2 (18)	0.01
Receptor soluble del factor de crecimiento vascular endotelial (ng/dL)			
Homocigoto normal	8.3 (1)	25 (2)	0.53
Heterocigoto	10.5 (2)	44.4 (4)	0.06
Homocigoto C677T	10 (1)	63.6 (7)	0.02
Total	9.7 (4)	46.4 (13)	0.001

\* Significativamente diferente que el genotipo homocigoto normal (C/C) en el mismo grupo.

metilentetrahidrofolato reductasa C677T. De las 69 mujeres incluidas en el estudio, se encontraron concentraciones anormales en 2 (10%) con genotipo negativo, 5 (17.8%) heterocigotas y 9 (42.8%) homocigotas ( $p = 0.03$ ). En el grupo control, las mujeres homocigotas tuvieron una incidencia más alta de concentraciones anormales de factor de von Willebrand que las heterocigotas o negativas ( $p = 0.02$ ). Se observó una tendencia similar en el grupo de pacientes con preeclampsia ( $p = 0.28$ ) (Cuadro 4). Las pacientes con preeclampsia también mostraron una prevalencia mayor de concentraciones anormales de sFlt1 en comparación con los controles. Esta diferencia también fue influida por el genotipo para metilentetrahidrofolato reductasa C677T. Las pacientes con preeclampsia homocigotas tuvieron una prevalencia mayor de sFlt1 anormal que los controles homocigotos (Cuadro 4).

Cuando la homocigidad para metilentetrahidrofolato reductasa se consideró una prueba de trombofilia positiva y la heterocigidad u homocigidad para el alelo normal, una prueba negativa, un número mayor de pruebas positivas (ya sea genotipo MTHFR, resistencia a la proteína C activada, vWF o sFlt1) se asoció con diagnóstico de preeclampsia. Se observó cuando menos una prueba positiva en 75% de las pacientes con preeclampsia, pero sólo en 48.7% de los controles (RM: 3.15; IC: 1.1-9.02). De hecho, 32.2% de las pacientes con preeclampsia tuvieron tres o más pruebas anormales, en contraste con el grupo control en el que sólo 2.4% de las pacientes fueron positivas para tres o más pruebas ( $p = 0.01$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio contribuyen a la determinación del papel de los polimorfismos asociados con trombofilia hereditaria en la patogénesis de la preeclampsia. Los resultados corroboran que ni el factor V de Leiden, ni la protrombina G20210A parecen estar asociados con la preeclampsia en la población mexicana, dada su baja prevalencia. Esta baja prevalencia contrasta de manera muy importante con la descrita en otras poblaciones con perfiles raciales distintos.<sup>2</sup>

Este estudio confirma que la frecuencia alélica del polimorfismo metilentetrahidrofolato reductasa C677T en la población mexicana es una de las más altas entre las hasta ahora descritas.<sup>5</sup> Ese polimorfismo coexistió en 50% de los individuos incluidos en este estudio y su ge-

notipo no tuvo una asociación directa con el diagnóstico de preeclampsia. Este resultado contrasta con lo descrito previamente en población mexicana por Perales-Dávila y colaboradores.<sup>6</sup> En su estudio, este grupo encontró la homocigidad en 5 de 13 pacientes con preeclampsia (38.4%) y sólo en 3 de 15 controles (20%). El análisis que aquí se reporta incluyó el doble de pacientes y controles, además de controlar para la severidad de la preeclampsia y la presencia de otros factores de riesgo, como diabetes e hipertensión gestacional.

A pesar de no haber confirmado la asociación entre el genotipo MTHFR C677T y preeclampsia descrita en estudios previos, se encontró evidencia indirecta de que el genotipo MTHFR C677T es un mediador protrombótico en la patogénesis de la preeclampsia: la homocigidad para este polimorfismo (T/T) se asoció con una alta incidencia de concentraciones anormales de tres marcadores distintos de activación endotelial, en contraste con la falta de asociación observada en pacientes no homocigotos. Esta asociación se observó únicamente en pacientes con preeclampsia y no en los controles.

La metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una enzima que cataliza la reducción de metilene tetrahidrofolato a metiltetrahidrofolato, mediante la participación de NADPH como sustrato reductor. A su vez, el metiltetrahidrofolato es una fuente de grupos metilo en la conversión de homocisteína en metionina, y juega un papel relevante en el metabolismo de aminoácidos y nucleótidos. El polimorfismo MTHFR C677T reduce la afinidad de la enzima por su cofactor FAD, lo que disminuye su actividad catalítica hasta en 50% e induce hiperhomocisteinemia.<sup>7</sup> Este estudio tiene la notable limitación de que no se realizaron mediciones de las concentraciones séricas de homocisteína. Sin embargo, estudios previos, incluidos algunos enfocados específicamente en la población mexicana, han documentado de manera muy exhaustiva que la MTHFR C677T, principalmente en su forma homocigota, se asocia con hiperhomocisteinemia leve en mujeres sanas, misma que se exacerba con factores como la edad avanzada y las concentraciones séricas disminuidas de folato, vitamina B<sub>6</sub> y vitamina B<sub>12</sub>.<sup>6,8</sup> Por lo tanto, es válido establecer la hipótesis de que existe una asociación fisiopatológica entre el polimorfismo y la activación endotelial mediada por homocisteína en pacientes con preeclampsia.

La resistencia a la proteína C activada es la manifestación fenotípica clásica del factor V de Leiden. En este

estudio, la incidencia de este polimorfismo fue muy baja, por lo que los casos de resistencia a la proteína C activada descritos aquí no pueden atribuirse al factor V de Leiden o, incluso, a polimorfismos aún más raros del factor V. Es muy posible que los casos de resistencia a la proteína C activada detectados en este estudio hayan sido transitoriamente adquiridos durante el embarazo. En este estudio se observó que el genotipo que influyó notablemente en las concentraciones de resistencia a la proteína C activada fue la homocigocidad para metilentetrahidrofolato reductasa.

Es posible que las anomalías en la función de la proteína C se asocien con concentraciones anormalmente elevadas de homocisteína. A este respecto, Undas y colaboradores han demostrado, en estudios *in vitro*, que la homocisteína impide la inactivación del factor V activado por la proteína C activada, mediante la unión covalente de la homocisteína con el factor V activado, a través de puentes disulfuro.<sup>9</sup> Sin embargo, la resistencia a la proteína C activada también podría ser causada por factores que modifiquen el fenotipo de la superficie endotelial de anticoagulante a procoagulante (por ejemplo, inhibición de la expresión de trombomodulina, activación trombomodulina-dependiente de la proteína C o supresión de la expresión de heparán sulfato), independientemente de las concentraciones de homocisteína.

Los estudios futuros deben encaminarse a determinar el papel de la homocisteína en la preeclampsia, en relación con la resistencia a la proteína C activada o factores protrombóticos putativos adicionales que promuevan la interrupción de la biología de la pared vascular.

En apoyo a la mencionada rotura de la biología de la pared celular, la prevalencia de concentraciones anormales de factor de von Willebrand y sFlt1, dos marcadores solubles de activación endotelial, fue significativamente mayor en pacientes con preeclampsia que en embarazadas sanas, lo cual es consistente con los resultados de estudios previos.<sup>4,10</sup> Sin embargo, un nuevo hallazgo de este estudio, que apoya una relación fisiopatogénica entre la trombofilia genética y la activación endotelial en la preeclampsia, es que en el grupo con preeclampsia, el genotipo homocigoto para metilentetrahidrofolato reductasa C677T también influyó notablemente en las concentraciones de estos marcadores séricos.

El factor de von Willebrand es un marcador no específico de activación endotelial y angiopatías trombóticas y las

variaciones en sus concentraciones séricas son un evento que ha sido descrito en pacientes con preeclampsia.<sup>10</sup> En este estudio también hubo una tendencia a concentraciones más elevadas de factor de von Willebrand en las pacientes con preeclampsia que en los controles. Además, en ambos grupos, las mujeres homocigotas para MTHFR C677T mostraron una tendencia a presentar concentraciones promedio y prevalencias de valores anormales mayores que las de las mujeres negativas para dicho genotipo. Las anomalías observadas en las concentraciones séricas de factor de von Willebrand son consistentes con un estado protrombótico en la preeclampsia.

El sFlt1 es una variante soluble del receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 1, un componente de un sistema regulador de la angiogénesis. La homocigocidad para MTHFR C677T se asoció con una alta prevalencia de concentraciones anormales de sFlt1. Éste es un hallazgo interesante debido a que la homocisteína tiene la capacidad de inhibir la función vasodilatadora de la microvasculatura a través de la disminución de las concentraciones de óxido nítrico.<sup>11</sup>

También se ha demostrado que la expresión de sFlt1 es estimulada por la hipoxia y por la inducción de factores de adhesión celular y que la producción de su ligando principal, el factor de crecimiento vascular endotelial, es inducida por la unión del factor VII activado al factor tisular y mediada por la trombina y el factor X activado.<sup>12</sup> Esta evidencia sugiere que la activación de la cascada de la coagulación es un evento al menos concomitante, y tal vez ligado causalmente a la angiogénesis disfuncional.

En este contexto, los aumentos en las concentraciones de sFlt1 en pacientes homocigotas para MTHFR C677T con preeclampsia podrían interpretarse como una respuesta a un suministro disminuido de oxígeno y podrían constituir un marcador bioquímico de disfunción endotelial inducido por el estado de hipercoagulabilidad, asociado con resistencia a la proteína C activada. Así, la hiperhomocisteinemia asociada con la homocigocidad para MTHFR C677T podría promover la exacerbación del estado de hipercoagulabilidad característico del embarazo, así como directamente desencadenar o contribuir al daño y disfunción endotelial en la vasculatura placentaria, iniciado por factores adicionales. Con base en ello, este estudio puede apoyar investigaciones futuras enfocadas en los nexos entre la disfunción endotelial, la trombosis y la

hipoxia, para dilucidar los mecanismos fisiopatogénicos de la preeclampsia.

A pesar de ser un estudio con un número reducido de pacientes y de que los resultados no pueden extenderse a la población general debido a la homogeneidad étnica de las pacientes, además de tratarse de un estudio en un centro de referencia, dichos resultados apoyan que la preeclampsia se vincula con la existencia de uno o varios factores protrombóticos y una disfunción de los mecanismos anti-trombóticos. La alta prevalencia del polimorfismo MTHFR C677T en la población estudiada permite que este estudio tenga un poder aceptable para detectar dicha asociación. La preeclampsia se asoció con elevación de marcadores séricos de activación endotelial en presencia de un genotipo protrombótico, todos los cuales pueden detectarse mediante pruebas de laboratorio relativamente simples. En retrospectiva, las pacientes con dos o más pruebas anormales tuvieron un riesgo mayor de ser pacientes con preeclampsia, que aquellas con una o ninguna prueba anormal. La implantación combinada de estas pruebas podría tener relevancia diagnóstica, aunque hacen falta más estudios para determinar su utilidad como factores predictivos sensibles y específicos de preeclampsia.

#### Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por el Programa Nacional de Servicio Social en Investigación en Salud y por el CONACYT.

#### REFERENCIAS

- Romero-Gutierrez G, Velasquez-Maldonado HA, Mendez-Sashida P, Horna-Lopez A, et al. [Placental histopathological changes in gestational hypertension]. *Ginecol Obstet Mex* 2008;76:673-678.
- Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340:9-13.
- Lindqvist PG, Svensson P, Dahlback B. Activated protein C resistance – in the absence of factor V Leiden – and pregnancy. *J Thromb Haemost* 2006;4:361-366.
- Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003;111:649-658.
- Ruiz-Arguelles GJ, Garces-Eisele J, Reyes-Nunez V, Ramirez-Cisneros FJ. Primary thrombophilia in Mexico. II. Factor V G1691A (Leiden), prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in thrombophilic Mexican mestizos. *Am J Hematol* 2001;66:28-31.
- Perales Davila J, Martinez de Villarreal LE, Triana Saldana H, Saldívar Rodríguez D, et al. [Folic acid levels, homocysteine and polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase enzyme (MTHFR) in patients with pre-eclampsia and eclampsia]. *Ginecol Obstet Mex* 2001;69:6-11.
- Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:14853-14858.
- Torres-Sanchez L, Chen J, Diaz-Sanchez Y, Palomeque C, et al. Dietary and genetic determinants of homocysteine levels among Mexican women of reproductive age. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:691-697.
- Undas A, Williams EB, Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* 2001;276:4389-4397.
- Baptista-Gonzalez HA, Rosenfeld-Mann F, Saavedra-Trejo MR, Castro-Lopez JL, Penuela-Olaya MA. [Changes in the thrombophilic status in patients with pre-eclampsia]. *Ginecol Obstet Mex* 1999;67:176-182.
- Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, et al. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997;272:17012-17017.
- Ollivier V, Chabbat J, Herbert JM, Hakim J, de Prost D. Vascular endothelial growth factor production by fibroblasts in response to factor VIIa binding to tissue factor involves thrombin and factor Xa. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1374-1381.