



UNIVERSIDAD DE NAVARRA

Dpto. de Hematología

**PREVALENCIA DEL FACTOR V LEIDEN Y LA MUTACIÓN
G20210A DEL GEN DE LA PROTROMBINA EN NAVARRA, Y SU
PAPEL COMO FACTORES DE RIESGO TROMBÓTICO.**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias

Fdo. Natalia Zabalegui Merino
Pamplona, Abril de 2000

Vº Bº Director

Vº Bº Director

Dr. Eduardo Rocha Hernando

Dr. Ramón Montes Díaz

Servicio de Publicaciones de la Universidad de Navarra

ISBN 84-8081-108-0

ABREVIATURAS

- aa Aminoácido o aminoácidos
- ACA Anticuerpos anticardiolipina
- ACV Accidente cerebrovascular
- ADN Acido desoxirribonucleico
- ARNm Acido ribonucleico mensajero
- AT III Antitrombina III
- Ca²⁺ Ion calcio
- DD Dímero D
- DE Desviación estándar
- dNTPs Desoxinucleosidos trifosfato
- EAP Enfermedad arterial periférica
- EDTA Ácido etilendiaminotetraacético
- EP Embolismo pulmonar
- F1+2 Fragmento (1+2) de la protrombina
- Fc Factor de coagulación
- Fca Factor de coagulación activado
- FII Protrombina
- FII:C Factor II coagulante
- FIIa Trombina
- FL Fosfolípido
- FV R506Q Factor V Leiden
- FV Factor V
- FVa Factor V activo
- FVL Factor V Leiden
- Protrombina G20210A Mutación en el gen de la protrombina
- I.C. Intervalo de confianza
- IAM Infarto agudo de miocardio
- IMC Índice de masa corporal
- nt Nucleótido
- O.R. *Odds ratio*
- p Valor de significación estadística (probabilidad)
- pb Pares de bases

- PC Proteína C
- PCA Proteína C activada
- PCR Reacción en cadena de la polimerasa
- PM Peso molecular
- PS Proteína S
- RPCA Resistencia a la proteína C activada
- SDS Dodecil sulfato sódico
- TAT Complejos trombina-antitrombina
- TM Trombomodulina
- TTPA Tiempo de tromboplastina parcial activada
- TEV Tromboembolismo venoso
- TV Trombosis venosa
- TVP Trombosis venosa profunda
- UV Ultravioleta

Índice

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I 1. HEMOSTASIA:.....	2
I 2. LA COAGULACIÓN DE LA SANGRE	3
I 2.1 <i>Mecanismos de activación de la coagulación</i>	3
I 2.1.1. Formación del complejo activador de protrombina.....	5
I 2.1.2 Conversión de la protrombina en trombina	7
I 2.1.3. Conversión del fibrinógeno en fibrina.....	7
I 2.2. <i>Mecanismos inhibidores de la coagulación</i>	9
I 2.2.1 TFPI.....	9
I 2.2.2. Antitrombina III (AT III) :.....	9
I 2.2.3 Sistema de la proteína C :.....	10
I 3. TROMBOEMBOLISMO VENOSO.....	13
I 4. ESTADOS DE HIPERCOAGULABILIDAD.....	14
I 4.1 <i>Estados trombofílicos congénitos</i>	15
I 4.2 <i>Estados trombofílicos adquiridos</i>	16
I 5. MUTACIÓN FV LEIDEN	18
I 5.1 <i>Gen que codifica para el FV</i>	20
I 5.2 <i>Funciones del FV</i>	20
I 5.3 <i>Estructura del FVa</i>	22
I 5.4 <i>FV Leiden</i>	23
I 5.5 <i>Epidemiología del FV Leiden</i>	26
I 5.6 <i>Importancia de la mutación FV Leiden</i>	26
I 6. POLIMORFISMO G20210A DEL GEN DE LA PROTROMBINA.....	28
I 6.1 <i>Protrombina y gen que la codifica</i>	28
I 6.2 <i>Funciones del Factor II</i>	29
I 6.3 <i>Polimorfismo G20210A</i>	30
I 6.4 <i>Epidemiología de G20210A</i>	31
I 6.5 <i>Importancia de G20210A</i>	32
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
III 1. MATERIAL.....	37
III 1.1 <i>Extracción ADN</i>	37
III 1.2 <i>Detección de las mutaciones</i>	37
III 1.2.1 FV Leiden	38
III 1.2.2 G20210A.....	38

III 1.3 Pruebas plasmáticas	38
III 2. SUJETOS DE ESTUDIO	38
III 2.1 Grupo control.....	39
III 2.2 Grupo de Pacientes.....	39
III 2.3 Datos registrados.....	39
III 3. PARTES DEL ESTUDIO	40
III 3.1 Prevalencia de las mutaciones en la población control.....	40
III 3.1.1 En la población general.....	40
III 3.1.2 En la población navarra	40
III 3.2 Prevalencia de las mutaciones en el grupo de pacientes	40
III 3.3 Analisis de FV Leiden y Protrombina G20210A como factores de riesgo de TEV.....	41
III 3.3.1 Cálculo del riesgo relativo asociado a las mutaciones.....	41
III 3.3.2 Influencia de FV Leiden y Protrombina G20210A en la edad del primer episodio trombótico	41
III 3.3.3 Influencia de FV Leiden y Protrombina G20210A en la recurrencia.....	41
III 3.4 Análisis de los posibles mecanismos fisiopatológicos de hipercoagulabilidad en la mutación G20210A de la protrombina.....	41
III 4. MÉTODOS	42
III 4.1. Obtención de muestras biológicas	42
III 4.1.1 ADN	42
III 4.1.2 Plasma	43
III 4.2. Técnicas de biología molecular.....	43
III 4.2.1 Detección de la mutación FV Leiden.....	44
III 4.2.2 Detección de la mutación G20210A de la protrombina.....	47
III 4.3. Técnicas funcionales plasmáticas.....	49
III 4.3.1 Resistencia a la proteína C activada.	49
III 4.3.2 Factor II coagulante	50
III 4.3.3 Fragmento 1+2 de la protrombina.....	51
III 4.3.4 Complejos trombina-antitrombina (TAT).....	52
III 4.3.5 Determinación del dímero-D	53
III 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	54
III 5.1 Estadística descriptiva.....	54
III 5.2 Estadística inferencial	55
Análisis de regresión logística univariante y multivariante.....	55
Análisis de asociación (mutación-factores de riesgo).....	56
Estudio de la influencia de las mutaciones en la edad del primer episodio trombótico	56
Estudio de la influencia de las mutaciones en la recurrencia	57

Mecanismos fisiopatológicos de hipercoagulabilidad en la mutación G20210A de la protrombina	57
III 6. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO	57
IV. RESULTADOS	58
IV 1. PREVALENCIA EN LA POBLACIÓN CONTROL	59
IV 1.1 <i>Prevalencia en la población control general</i>	59
IV 1.2 <i>Prevalencia en la población control navarra</i>	60
IV 2. PREVALENCIA EN UNA POBLACIÓN DE PACIENTES CON TEV	61
IV 3. ANÁLISIS DE FV LEIDEN Y PROTROMBINA G20210A COMO FACTORES DE RIESGO DE TEV.....	65
IV 3.1 <i>Cálculo de los riesgos relativos de TEV.</i>	65
IV 3.1.1 Estimación de la <i>O.R.</i> cruda	66
IV 3.1.2 Estimación de la <i>O.R.</i> ajustada.	67
IV 3.2 <i>Asociación entre estas dos mutaciones y otros factores de riesgo</i> 68	
IV 3.3 <i>Análisis de la influencia de FV Leiden y Protrombina G20210A en la patología trombotica venosa.</i>	69
IV 3.3.1 Influencia de FV Leiden y Protrombina G20210A en la edad del primer episodio trombotico	69
IV 3.3.2 Influencia de FV Leiden y Protrombina G20210A en la recurrencia.....	72
IV 4. ANÁLISIS DE POSIBLES MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE HIPERCOAGULABILIDAD EN LA MUTACIÓN G20210A DE LA PROTROMBINA..	75
IV 4.1 <i>Protrombina G20210A y factor II coagulante (FII:C)</i>	75
IV 4.2 <i>G20210A y marcadores de hipercoagulabilidad</i>	76
IV 4.2.1 F1+2.....	76
IV 4.2.2 TAT.....	77
IV 4.2.3 Dímero D	78
V. DISCUSIÓN.....	80
V 1. FV LEIDEN	81
V 1.1 <i>Prevalencia en la población control</i>	81
V 1.2 <i>Prevalencia en la población con TEV</i>	84
V 1.3 <i>FV Leiden como factor de riesgo de TEV</i>	86
V 1.4 <i>Asociación con otros factores de riesgo trombotico</i>	89
V 1.5 <i>Edad del primer episodio trombotico</i>	98
V 1.6 <i>FV Leiden como factor de recurrencia trombotica</i>	99
V 2. PROTROMBINA G20210A	101
V 2.1 <i>Prevalencia en la población control</i>	101
V 2.2 <i>Prevalencia en la población con TEV</i>	102
V 2.3 <i>Protrombina G20210A como factor de riesgo de TEV</i>	104

V 2.4 Asociación con otros factores de riesgo.....	106
V 2.5 Edad del primer episodio trombótico.....	109
V 2.6 Protrombina G20210A y recurrencia de TEV.....	111
V 3. FV LEIDEN Y PROTROMBINA G20210A	113
V 3.1 Prevalencia en la población control	113
V 3.2 Prevalencia en la población con TEV.....	113
V 3.3 Ambas mutaciones como factor de riesgo de TEV.....	114
V 3.4 Ambas mutaciones y edad del primer episodio de TEV.....	116
V 3.5 Ambas mutaciones y recurrencia de TEV	117
V 4. POSIBLES MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE HIPER- COAGULABILIDAD EN LA MUTACIÓN PROTROMBINA G20210A.....	120
VI. CONCLUSIONES	126
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	129

I. Introducción

I 1. HEMOSTASIA:

El término hemostasia se refiere a un conjunto de mecanismos cuyo fin es evitar una pérdida sanguínea, si se ha producido una solución de continuidad en los vasos, y el de restablecer la circulación sanguínea cuando surge una obstrucción.

De forma esquemática pueden clasificarse estos mecanismos en:

1. Espasmo vascular
2. Hemostasia primaria
3. Coagulación de la sangre
4. Fibrinólisis

Ante una lesión vascular el estímulo del vaso traumatizado provoca que su pared se contraiga; esto reduce al instante la salida de sangre por la zona rota. Cuanto mayor sea la lesión que sufra el vaso mayor será la intensidad del espasmo vascular.

A nivel de cualquier lesión de un vaso, la pared vascular dañada o el tejido extravascular desencadenan un círculo vicioso de activación de un número creciente de plaquetas. Cuando las plaquetas entran en contacto con una superficie vascular dañada cambian de inmediato sus características de manera drástica, acumulándose para formar un tapón.

Este mecanismo es muy importante para cerrar pequeñas roturas de vasos sanguíneos diminutos que ocurren centenares de veces al día, incluyendo las que se producen a través de las propias células endoteliales y que en general se cierran por fusión de las plaquetas a las células endoteliales para formar una membrana endotelial continua.

Si el desgarro producido por un vaso es pequeño, el tapón de plaquetas puede impedir la pérdida de sangre por completo; si el desgarro es grande, además del tapón de plaquetas es necesario que la sangre se coagule para interrumpir la hemorragia.

Sustancias activadoras procedentes de la pared vascular traumatizada y de las plaquetas, y proteínas sanguíneas que se adhieren al colágeno de la pared lesionada inician el proceso de la coagulación, que tiene como fin la formación de una proteína, la fibrina, capaz de polimerizar y formar retículos insolubles. Tras la formación del coágulo, éste cubre toda la abertura o extremo roto del vaso. Este coágulo se retraerá con la finalidad de cerrar

todavía más el vaso. Las plaquetas desempeñan un papel importante en esta retracción del coágulo, cuya evolución natural consiste en la invasión por fibroblastos hasta la sustitución por tejido fibroso.

El mecanismo de la coagulación de la sangre se expondrá posteriormente con más detalle, porque su conocimiento es esencial para seguir el presente trabajo.

La principal función del sistema fibrinolítico es disolver los coágulos de fibrina, ya que estos no son estructuras fisiológicas permanentes, sino que una vez cumplida su labor hemostática deben ser eliminados para permitir nuevamente el flujo de sangre por el vaso; debe encontrarse por lo tanto en equilibrio con el sistema de la coagulación.

Este proceso de la fibrinólisis se caracteriza por la producción de plasmina a partir de un precursor inactivo del plasma, el plasminógeno. La activación de éste se efectúa a través de un activador tisular. La plasmina lisa los polímeros de fibrina a productos solubles de degradación, destruyendo por tanto la integridad del coágulo. El endotelio desempeña un papel importante por ser lugar de síntesis y/o almacenamiento de algunos de los principales activadores e inhibidores del sistema. El sistema fibrinolítico constituye la principal defensa del organismo contra el depósito anormal de fibrina sobre la pared vascular, por lo que representa una importante protección frente a los procesos trombóticos.

I 2. LA COAGULACIÓN DE LA SANGRE

I 2.1 Mecanismos de activación de la coagulación

La coagulación de la sangre es un proceso complejo, multifactorial y sobre todo dinámico cuyas alteraciones pueden ocasionar fenómenos hemorrágicos o trombóticos y, en ocasiones, ambos simultáneamente.

Se han descubierto aproximadamente 50 sustancias diferentes que afectan a la coagulación de la sangre, presentes en ella y en los tejidos, unas estimulan la coagulación, llamadas *procoagulantes*, y otras que la inhiben llamadas *anticoagulantes*. El hecho de que la sangre coagule o no coagule depende de un equilibrio entre estos dos tipos de sustancias. Normalmente predominan las anticoagulantes y la sangre sigue su paso sin coagular pero, cuando se rompe un vaso, la actividad de los procoagulantes en la zona lesionada es mucho mayor que la de los anticoagulantes y se desarrolla un coágulo.

La coagulación plasmática consiste en la transformación del fibrinógeno (soluble) en fibrina (insoluble) por la acción de la trombina, enzima proteolítica que se forma por la activación de la protrombina. El proceso se lleva a cabo mediante una reacción en cascada de los factores de coagulación en la que ocurre la activación de los proenzimas.

Con excepción del calcio, los factores de la coagulación son proteínas que se pueden agrupar en tres grupos: factores dependientes de la vitamina K, factores sensibles a la trombina y factores de contacto.

Los factores vitamino K dependientes son la protrombina (FII) y los factores VII, IX y X. Se sintetizan en los hepatocitos y son serín proteasas estables que, con excepción de la protrombina, no se consumen en el proceso de la coagulación y por lo tanto se hallan en el suero.

Los factores sensibles a la trombina son el fibrinógeno (FI) y los factores V, VIII y XIII. Son moléculas de alto peso molecular y se consumen en el proceso de coagulación. Los factores V y VIII si bien no son enzimas aceleran las reacciones enzima-sustrato en las que intervienen como cofactores.

Los factores de contacto son los factores XII y XI, la precalicreína y el cininógeno de alto peso molecular. Todos actúan en la primera fase de la coagulación y también desencadenan la fibrinólisis.

En el proceso de la coagulación sanguínea se distinguen tres fases:

- Formación del “*Complejo activador de la protrombina*” en respuesta a la rotura del vaso o a la lesión de la propia sangre.
- El activador de la protrombina cataliza la conversión de protrombina en trombina.
- La trombina actúa como enzima para convertir el fibrinógeno en hilos de fibrina que engloban los glóbulos rojos, las plaquetas y el plasma para formar el coágulo propiamente dicho.

I 2.1.1. Formación del complejo activador de protrombina

Hay dos mecanismos principales.

- 1) Vía extrínseca. Se inicia por el traumatismo de la pared vascular o de los tejidos vecinos.
- 2) Vía intrínseca. Se inicia en la propia sangre.

Vía extrínseca:

El mecanismo extrínseco se activa cuando la sangre entra en contacto con el tejido (Figura 1). Tiene lugar según las siguientes tres etapas:

- Liberación de factor tisular por el tejido.
- Activación del factor X para formar factor X activado (Xa). Es papel del factor tisular junto con el factor VII.
- El factor Xa forma un complejo con fosfolípidos tisulares (FL) y con el FV activo (FVa) para formar el complejo denominado *activador de protrombina* o complejo protrombinasa.

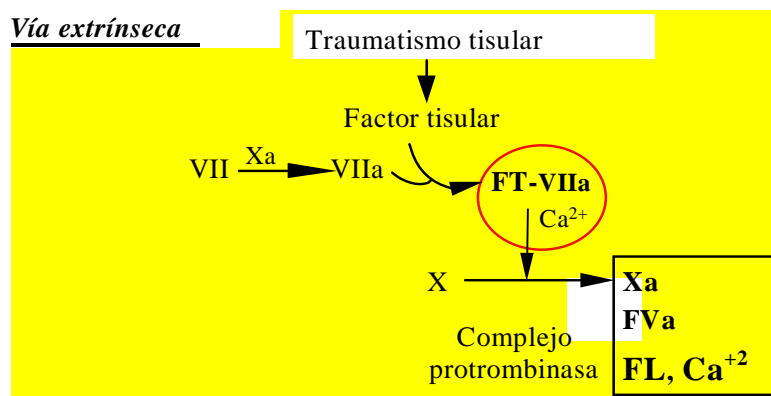


Figura 1: La vía extrínseca, rápida, se inicia por el factor tisular liberado a partir de las células endoteliales lesionadas.

Vía intrínseca

El otro mecanismo para la formación del activador de la protrombina y, por tanto, para iniciar la coagulación, empieza con la exposición de la sangre

al colágeno en la pared vascular (Figura 2).

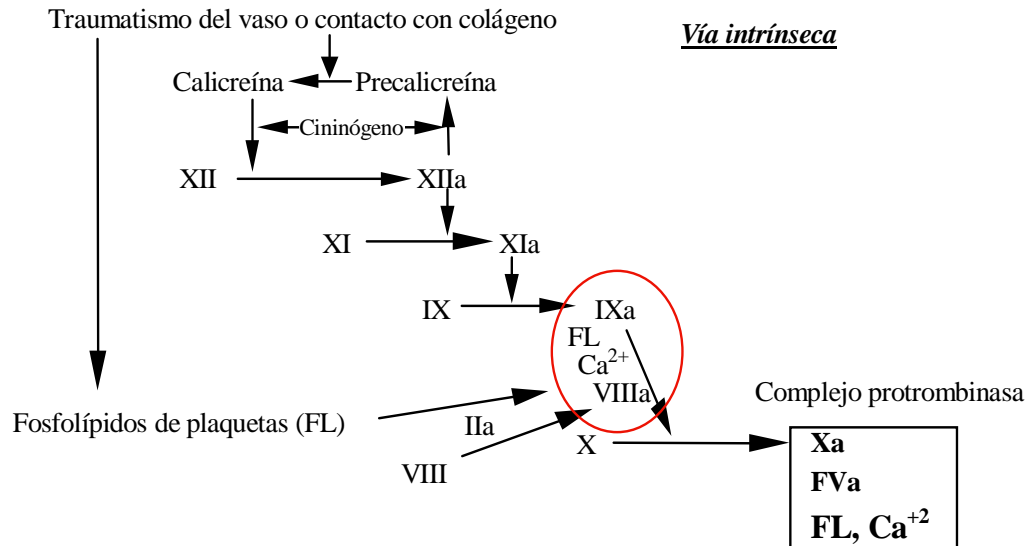


Figura 2: La secuencia de reacciones de la vía intrínseca se inicia por la asociación del FXII con una superficie cargada negativamente.

Podemos distinguir 5 pasos hasta obtener el complejo activador de protrombina o complejo protrombinasa.

1. Activación del factor XII y liberación de los fosfolípidos por las plaquetas. Cuando se altera el FXII, como sucede cuando entra en contacto con el colágeno o con una superficie húmeda como el vidrio, adopta una nueva configuración que le convierte en una enzima proteolítica que se llama factor XII activado (FXIIa).
2. Activación del factor XI. El factor XIIa actúa sobre el FXI para activarlo. Esta reacción requiere cininógeno y es acelerada por la precalicreína.
3. Activación del factor IX por el factor XIa.
4. Activación del factor X. El factor IXa junto con el FVIII y con los fosfolípidos procedentes de las plaquetas activa el factor X.
5. Formación del complejo activador de protrombina o complejo protrombinasa, junto con el FVa y fosfolípidos.

I 2.1.2 Conversión de la protrombina en trombina

El complejo protrombinasa transforma la protrombina en trombina. Este es el comienzo de la vía común de la coagulación. La enzima activa de esta reacción (FXa) es vitamino K dependiente, y la velocidad de reacción y su eficiencia se multiplican si los demás cofactores están presentes (el FVa, los fosfolípidos cargados negativamente y calcio) (Figura 3).

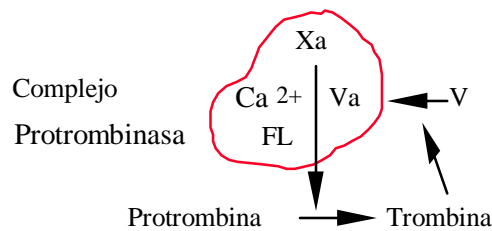


Figura 3: Esquema de la conversión de la protrombina en trombina.

Al principio, el FV del complejo protrombinasa es inactivo, pero una vez iniciada la coagulación la acción proteolítica de la trombina activa al FV, que se convierte a continuación en un acelerador adicional poderoso de la activación de la protrombina. Por tanto en el complejo activador de protrombina final el FXa es la proteasa real que produce desdoblamiento de la protrombina en trombina, y el FVa y los fosfolípidos aceleran en gran medida esta actividad de proteasa. Cabe destacar el efecto de retroalimentación positiva de la trombina que actúa por medio del FV para acelerar todo el proceso una vez iniciado.

I 2.1.3. Conversión del fibrinógeno en fibrina

La aparición de la trombina, una potente serín-proteasa, acelera bruscamente el proceso de coagulación, que terminará con la formación de fibrina estabilizada.

El fibrinógeno es una proteína plasmática producida en el hígado cuya principal propiedad es la de ser coagulable por la trombina. La trombina libera cuatro péptidos de bajo peso molecular llamados fibrinopéptidos A y B de la molécula de fibrinógeno, dando lugar al monómero de fibrina. Los monómeros

se unen entre sí, pero con uniones electrostáticas poco estables, por lo que esta fibrina es soluble hasta la acción del factor XIII activado por la trombina, que actúa como estabilizador porque establece puentes disulfuro entre los monómeros de fibrina, que de este modo es más firme y menos sensible a la acción lítica de la plasmina (Figura 4).

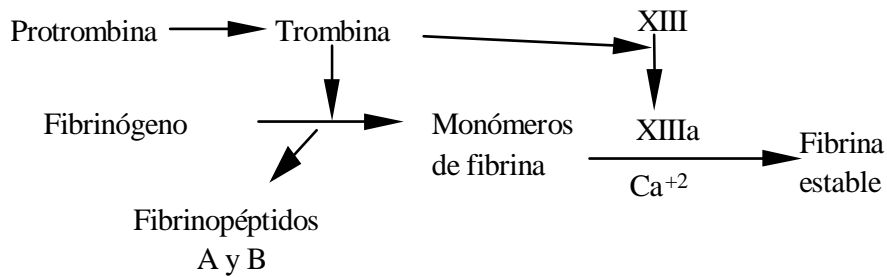


Figura 4: Fibrinoformación.

Un esquema general de la coagulación de la sangre nos permite tener una idea general de todo el proceso seguido (figura 5).

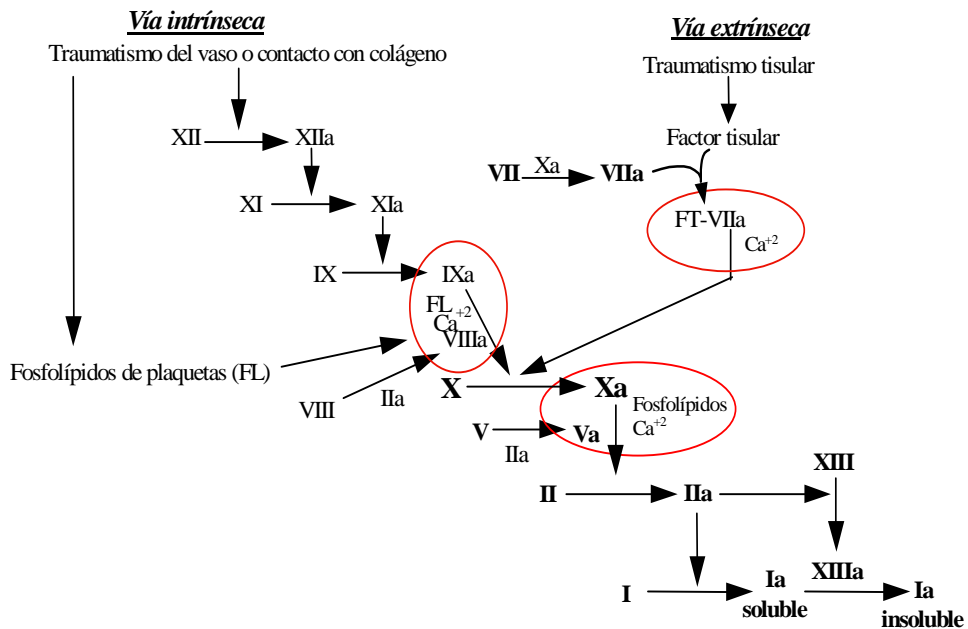


Figura 5: Cascada de la coagulación de la sangre.

Tanto el FV como el FII o protrombina son protagonistas de este trabajo, por lo que estudiaremos sus funciones con más detenimiento.

I 2.2. Mecanismos inhibidores de la coagulación

En el plasma sanguíneo los factores de coagulación circulan en exceso en forma de pro-enzimas, las cuales se activan de forma sucesiva transformándose en enzimas. Esta “cascada de la coagulación” presenta un perfecto equilibrio con el mecanismo de la fibrinólisis. Este equilibrio está establecido por mecanismos de control que incluyen, no sólo la remoción por parte del hígado y del sistema reticuloendotelial de los factores activados, sino de sistemas de protección adicional que evitan una exagerada activación.

Se conocen inhibidores de la coagulación tanto en la vía extrínseca (TFPI) como en la vía intrínseca (antitrombina III y sistema de la proteína C).

I 2.2.1 TFPI

El TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) inhibe al factor tisular en presencia de factores VIIa y Xa. El TFPI parece ser un anticoagulante natural que sirve de inhibidor de las pequeñas cantidades de factor tisular liberado durante la actividad diaria. [1].

I 2.2.2. Antitrombina III (AT III) :

La antitrombina III es una proteína plasmática que pertenece a la familia de las serpinas. Es un inhibidor de proteasas cuya principal función es la neutralización de la actividad de la trombina y de otras serín proteasas de la vía intrínseca de la coagulación (FXa, FXIIa, FXIa y FIXa). En ausencia de heparina esta reacción ocurre muy lentamente. También actúa sobre otras serín proteasas que no pertenecen a la cascada de la coagulación como plasmina, uroquinasa o tripsina. [2,3] (Figura 6).

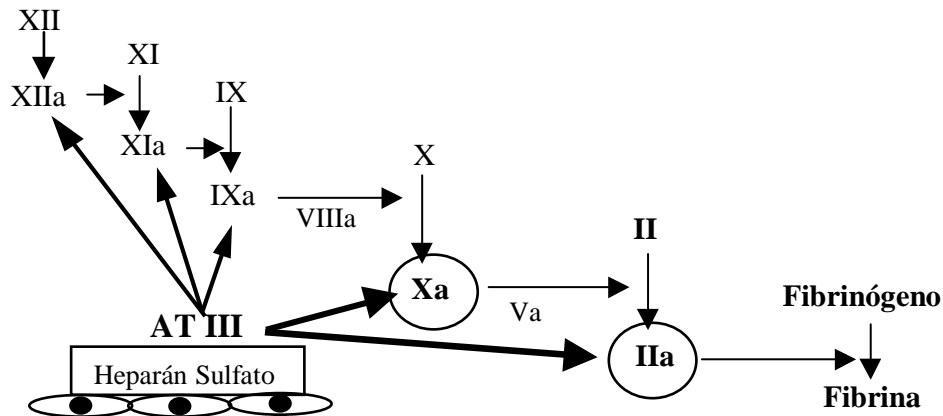


Figura 6: Acción anticoagulante de la antitrombina III.

I 2.2.3 Sistema de la proteína C :

La proteína C (PC) es una molécula clave en la vía anticoagulante natural implicada en un complejo y potente mecanismo anticoagulante comúnmente denominado sistema de la PC [4-6]. También conviene estudiar este sistema con detenimiento para la comprensión de este trabajo.

Estructura de la PC:

La PC es una proteína vitamino K dependiente. Circula en plasma como zimógeno de una serín proteasa a una concentración de 3 a 5 $\mu\text{g/ml}$ y su vida media es de seis a ocho horas [7-10]. Presenta gran afinidad por el calcio así como por los fosfolípidos cargados negativamente.

La PC es sintetizada en el hígado [11,12] y está formada por una cadena ligera (155 aminoácidos (aa)) y una cadena pesada (262 aa) [13,14]. Es una molécula multimodular que presenta un módulo rico en ácido γ carboxiglutámico (Gla), dos módulos similares a los del factor de crecimiento epitelial (EGF) y un módulo serín proteasa [11-15]. El módulo Gla presenta gran afinidad por los fosfolípidos cargados negativamente. Este módulo también parece interactuar con la trombomodulina durante la activación de la PC [7,16]. Los módulos semejantes al EGF presentan gran afinidad por el

calcio. Parece ser que el primero de estos dos módulos interactúa con la trombina y con la proteína S (PS) [17,18].

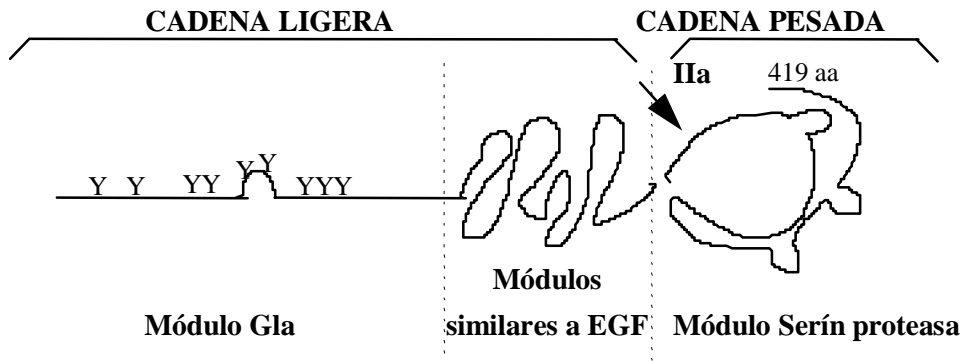


Figura 7: Estructura de la PC humana con 9 residuos en el módulo Gla (Y). La flecha indica el punto de activación de la PC. Figura tomada de Dahlbäck [7].

Activación de la PC:

La ruptura mediada por la trombina de un péptido de la cadena pesada permite la activación de la proteína [10-15,19]. Para esta función la trombina utiliza a la trombomodulina como cofactor. La trombomodulina es una proteína multimodular de la membrana endotelial. La trombina presenta gran afinidad por este receptor de membrana. La unión de ambas provoca en la primera un cambio en la especificidad por sustrato, perdiendo sus propiedades procoagulantes (coagular fibrinógeno, activar plaquetas y factores V y VIII) y siendo ahora capaz de activar a la PC en presencia de Ca^{2+} (Figura 8) [7,20-22].

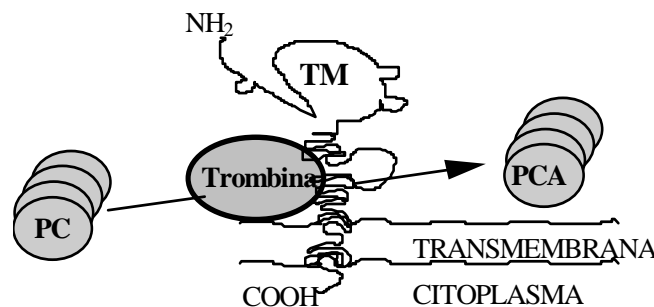


Figura 8: Activación de la PC. Figura tomada de Dahlbäck [7]

Acción anticoagulante de la Proteína C activada:

La Proteína C activada (PCA) degrada proteolíticamente los factores Va y VIIIa controlando de esta manera su potente acción procoagulante (Figura 9).

La PCA es altamente específica, ya que no actúa sobre dichos factores en sus formas inactivas. La larga vida media de la PCA y su especificidad por las formas activas de FV y FVIII son requisitos indispensables para el perfecto funcionamiento de la PCA como anticoagulante circulante *in vivo* [23].

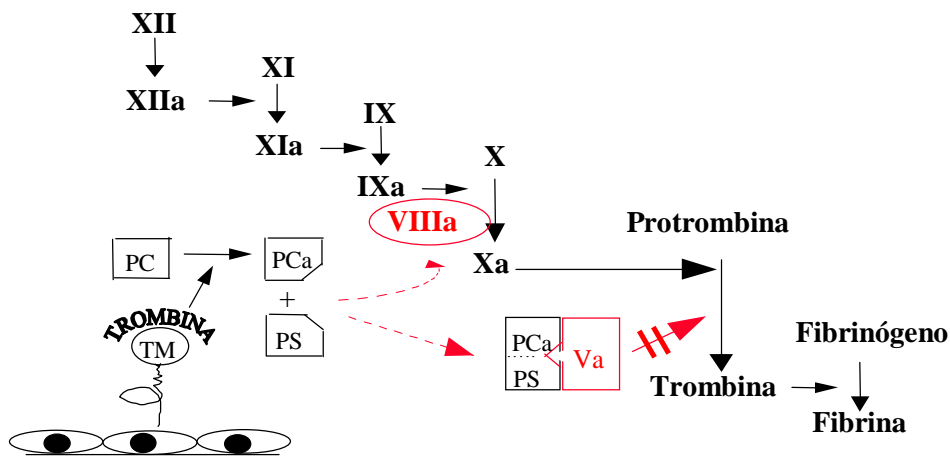


Figura 9: Acción anticoagulante de la PCA en la cascada de la coagulación.

La actividad anticoagulante de la PCA es potenciada por su cofactor PS. La PS se presenta de dos formas: como proteína libre (30-40%) y unida a la *proteína de unión al C4B* (C4Bbp), reguladora del sistema del complemento. Sólo la forma libre puede ejercer la labor de cofactor de la PCA [24].

I 3. TROMBOEMBOLISMO VENOSO

La formación de coágulos o trombos intravasculares en el sistema venoso recibe el nombre de trombosis venosa (TV). Una vez que el trombo se desarrolla es probable que el flujo sanguíneo lo desprenda de su origen y lo lleve con la sangre; a estos coágulos libres se les conoce como émbolos. El término tromboembolismo venoso (TEV) engloba tanto a los eventos trombóticos no embólicos como a los embólicos.

Una vez formado el coágulo, crece principalmente en la dirección del flujo sanguíneo y a veces ocupa la longitud total de las venas. Una de cada 10 veces una gran parte del coágulo (émbolo) se desprende de su sitio de origen y flota libremente en el sistema venoso hasta alcanzar las arterias pulmonares donde puede causar una embolia pulmonar masiva. Si el coágulo es de tamaño suficiente para ocluir ambas arterias pulmonares, sobreviene la muerte de forma inmediata. Si sólo se obstruye una arteria pulmonar o una rama pequeña puede no ocurrir la muerte; sin embargo, el embolismo puede causarla varias horas o varios días después debido a la expansión del coágulo dentro de los vasos pulmonares.

La importancia clínica del TEV incrementó el interés por identificar aquellos individuos susceptibles de desarrollarlo y así adoptar las medidas terapéuticas o profilácticas más adecuadas en cada caso. La incidencia del TEV no se conoce con exactitud, aunque se estima en un caso por cada 1.000 habitantes [25] al año, mientras que entre los pacientes hospitalizados puede llegar a ser del 1% [26].

Con respecto a la etiología del TEV, hay una serie de factores de riesgo que cuando están presentes en un individuo le ponen en una situación definida como “estado de hipercoagulabilidad”, aumentando las probabilidades de experimentar un episodio de TEV [27,28]. De estos factores hablaremos más adelante. Es también conocida la tendencia familiar en algunos casos a desarrollar la enfermedad [29]. Así surgió el concepto de trombofilia hereditaria que hoy en día se define como: *una tendencia genéticamente*

determinada al tromboembolismo venoso. Tanto anomalías dominantes, en algunos casos, como combinaciones de defectos más leves, en otros, pueden ser aparentes clínicamente con edad temprana de inicio, recidivas frecuentes o historia familiar de trombosis. Los rasgos leves pueden ser sólo revelados mediante investigación de laboratorio. Todavía no se conocen ni se han comprendido todas las influencias genéticas ni sus interacciones [30].

I 4. ESTADOS DE HIPERCOAGULABILIDAD

Varios mecanismos anticoagulantes naturales van a oponerse a las acciones procoagulantes de la cascada de la coagulación, operando a nivel local y tratando de focalizar la formación del coágulo en el lugar adecuado y en el tiempo preciso (Figura 10).

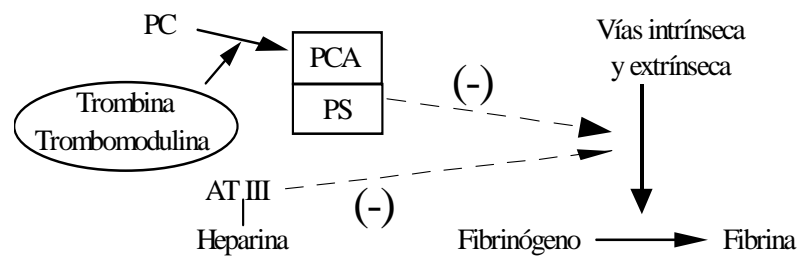


Figura 10: Acción anticoagulante de la PC y de la Antitrombina III.

El estado hipercoagulable podría definirse como un predominio patológico de los mecanismos procoagulantes sobre los anticoagulantes, cuya consecuencia será el desarrollo de trombosis [31-33]. Los mecanismos procoagulantes serían responsables de una continua generación de trombina en el árbol vascular, a la que no podrían neutralizar los mecanismos anticoagulantes naturales que acabamos de citar [34]. Para clasificar los estados trombofílicos se han propuesto diversas clasificaciones [32,35], pero quizá la más sencilla y clara es la que los divide en dos grandes grupos: congénitos y adquiridos [36] (Tabla I).

Tabla I: Tabla de clasificación de los estados trombofílicos.

<p>ESTADOS HIPERCOAGULABLES CONGÉNITOS</p> <ul style="list-style-type: none">- Déficit de AT III- Deficiencia de proteína C- Deficiencia de proteína S- Deficiencia de cofactor II de la heparina- Disfibrinogenemias- Patología de la fase contacto- Patología del sistema fibrinolítico<ul style="list-style-type: none">• Hipoplasminogenemia• Displasminogenemia• Déficit de t-PA• Aumento de PAI-1- RPCA- FV Leiden- Protrombina G20210A- Hiperhomocisteinemia
<p>ESTADOS HIPERCOAGULABLES ADQUIRIDOS</p> <ul style="list-style-type: none">- Primarios<ul style="list-style-type: none">• Síndrome antifosfolípido primario.- Secundarios<ul style="list-style-type: none">- Anomalías de coagulación y fibrinólisis:<ul style="list-style-type: none">• Sepsis.• Neoplasias.• Embarazo.• Cirugía mayor.• Anticonceptivos orales.• Infusión de concentrados protrombóticos.• Síndrome nefrótico- Anomalías plaquetares:<ul style="list-style-type: none">• Síndromes mieloproliferativos.• Hiperlipemia.• Diabetes mellitus.• Trombopenia heparino-dependiente.- Anomalías vasculares y reológicas:<ul style="list-style-type: none">• Éstasis venoso.• Superficies artificiales.• Hiperviscosidad.• Púrpura trombótica trombocitopénica.• Vasculitis.

I 4.1 Estados trombofílicos congénitos

Se definen como estados de hipercoagulabilidad congénitos o trombofilia primaria aquellas situaciones en las que una alteración genética específica del sistema hemostático condiciona estados protrombóticos o de susceptibilidad hereditaria para el padecimiento de trombosis [37].

En los últimos años se ha asistido a un espectacular avance en este campo, habiéndose descrito mutaciones en una serie de genes que parecen predisponer a un estado trombótico. Estos genes incluyen al menos los de AT III, PC, PS, los responsables de la resistencia a la proteína C activada (RPCA) y el gen de la protrombina (G20210), aunque continuamente se describen nuevas alteraciones [30,38-41].

La existencia de una única anomalía genética como factor responsable de hipercoagulabilidad es poco frecuente, por lo que parece que la expresión clínica trombofílica debe de ser la expresión de una alteración multigénica [42-45]. La aparición de trombosis en sujetos portadores de estas anomalías genéticas parece estar además asociada a otros factores de riesgo ambientales como cirugía, embarazo, puerperio, traumatismos y otros. [37,46-49].

Clínicamente, los estados de hipercoagulabilidad primaria vienen definidos por la localización trombótica preferentemente en territorio venoso, especialmente en extremidades inferiores, tanto a nivel vascular periférico como profundo, aunque también pueden aparecer en otras áreas poco frecuentes como la región mesentérica, cerebrovascular o pulmonar [47,50].

Los principales estados trombofílicos congénitos son los clásicos déficits de AT III, PC y PS, y los más recientemente descritos tales como RPCA, FV Leiden y la mutación G20210A en el gen de la protrombina. [34] y la hiperhomocisteinemia causada por la mutación Ala677→Val en el gen de la metilen tetrahidrofolato reductasa [51].

I 4.2 Estados trombofílicos adquiridos

Los estados de hipercoagulabilidad secundarios comprenden un amplio

grupo de procesos clínicos (anomalías de la coagulación y la fibrinólisis, anomalías plaquetares y anomalías vasculares y reológicas), en los que se sabe que la interacción de mecanismos patogénicos complejos da lugar a una situación en la que existe riesgo evidente de que se produzcan complicaciones tromboticas tanto arteriales como venosas [52]. En la mayoría de los casos no existe un marcador específico capaz de definir la existencia de una tendencia trombotica y sólo podemos valernos de la utilización de algunos parámetros usados habitualmente como marcadores de hipercoagulabilidad, pero cuya utilidad real no es bien conocida hasta el momento [53]. La realización de estudios clínicos tratando de establecer una relación entre los niveles de marcadores plasmáticos y el riesgo de trombosis, o la existencia de un estado pretrombótico, presenta grandes dificultades. Probablemente, de todos los marcadores conocidos, los que en la actualidad tienen un valor más contrastado son: 1) el fragmento 1+2 de la protrombina (F1+2) [54-56] y complejos trombina-antitrombina (TAT) como expresión de la generación de trombina por un aumento de la actividad por el FXa [54,57]; 2) FPA (fibrinopéptido A) como expresión de aumento de la actividad de la trombina y generación de fibrina [58,59]; 3) dímero D (DD) cuyo aumento estaría en relación con un incremento de la generación de fibrina y un aumento de la actividad de la plasmina [60] y 4) PAI-1 (inhibidor del activador de la plasmina) cuyo aumento explicaría una disminución de la actividad fibrinolítica.

I 5. MUTACIÓN FV LEIDEN

Durante la década de los 80 y principios de los 90 eran muchos los trabajos realizados para la investigación de los factores hereditarios hasta entonces descritos. Sin embargo, los trastornos conocidos en torno a los déficits de ATIII, PC y PS sólo podían explicar un 10-15% de los casos de TEV estudiados [61].

En 1993 Dahlbäck [62] presentó un trabajo en el que tras realizar un sencillo ensayo *in vitro* con plasmas de individuos con historia familiar de trombosis, observaba una pobre respuesta anticoagulante tras la adición de PCA. El estudio se basaba en la prueba coagulante del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA).

El TTPA consiste en añadir activadores de la vía intrínseca (FL, Ca^{2+}) al plasma del paciente *in vitro* y cronometrar el tiempo que tarda en formarse el coágulo. La modificación de Dahlbäck consistía en calcular un cociente a partir de dos TTPA, calculados uno en presencia y otro en ausencia de PCA.

La PCA degrada proteolíticamente los factores Va y VIIIa por lo que, lógicamente, al añadir PCA el tiempo de coagulación debería alargarse. Dahlbäck y colaboradores realizaron el ensayo PCA-TTPA para determinar la respuesta anticoagulante del plasma tras añadir PCA purificada, y vieron que el plasma de un hombre de mediana edad con historia de múltiples episodios inexplicados de trombosis se presentó completamente resistente a la PCA. En otras palabras, la adición de PCA, sorprendentemente, no aumentaba el TTPA. Asimismo, los resultados obtenidos en una serie importante de pacientes tampoco fueron los esperados, ya que se observó una escasa respuesta anticoagulante tras la adición de distintas concentraciones de PCA. Esta respuesta fue denominada resistencia a la proteína C activada (RPCA) [62].

Tras estudiar el plasma de individuos pertenecientes a una misma familia con alta incidencia de trombosis se descartaron como responsables de esta RPCA una deficiencia de PS, la presencia de anticuerpos anti-proteína C

o la acción rápida de una proteasa inhibidora de la PCA. Este rasgo fenotípico parecía seguir una transmisión autosómica dominante [63] y se asociaba con la tendencia trombótica.

Poco más tarde Griffin [64] publicó un estudio en el que la RPCA se presentaba en un 64% de los pacientes con trombofilia inexplicada. El número de casos estudiados era muy bajo por lo que este resultado tenía un escaso valor estadístico. Varios estudios realizados por cuatro grupos distintos concluían que la incidencia de la RPCA era aproximadamente el 20% en pacientes consecutivos no seleccionados y alrededor del 50% en pacientes seleccionados con historia de trombosis familiar o personal [65]

Estos datos, comparados con la baja prevalencia (5%) observada en la población control [66] permitieron deducir que la RPCA es un factor de riesgo para tromboembolismo venoso, con una incidencia además bastante más elevada que otras anomalías hereditarias de la vía anticoagulante descritas hasta entonces, tales como las responsables de los déficits de PC, PS o ATIII.

El siguiente objetivo era, por tanto, aislar y caracterizar el factor responsable de esa escasa respuesta anticoagulante a la PCA. Durante un tiempo se barajaron numerosos mecanismos como causa de la RPCA [62]:

- * Presencia de autoanticuerpos contra PC.
- * Presencia de anticuerpos antifosfolípido (inhibiendo la función de la PCA).
- * Eficiente inhibidor de la PCA como por ejemplo un inhibidor de serín proteasas.
- * Deficiencia de PS funcional.
- * Mutaciones en los puntos de inactivación de los factores VIII o V.
- * Deficiencias de un cofactor de la PCA no conocido hasta el momento.

En 1994, Dahlbäck y su equipo de investigadores [67] demostraron que ese factor causante de la RPCA no era otro que el FV, que en esos pacientes se mostraba más resistente a la acción proteolítica de la PCA. Esta conclusión fue apoyada por otros grupos, que a su vez descartaron la implicación de un FVIII anómalo como causa de la RPCA [4,68].

El FV parcialmente aislado de plasma resistente a la PCA podía transferir el fenotipo RPCA a una muestra de plasma normal [68]. Este estudio parece confirmar la hipótesis de que la RPCA es causada por un defecto molecular en el gen del FV [68]. El siguiente paso sería por tanto tratar de localizar la anomalía molecular en el gen del FV.

En 1994, Bertina y cols [4]localizaron una mutación puntual en el exón 10 de dicho gen. Este descubrimiento fue corroborado por otro grupos de investigación [5,68,69]. Un nucleótido guanina (G) en la posición 1691 es sustituido por una adenina (A). Esta mutación provoca un nuevo codón que cambia la arginina (R) de la posición 506 en la proteína por una glutamina (Q). Se demostró que esta mutación, que fue denominada FV Leiden, FV: Q⁵⁰⁶ ó FV R506Q, permitía al FVa ser resistente a la acción proteolítica de la PCA, incrementándose anormalmente la generación de trombina y provocándose así un estado de hipercoagulabilidad.

I 5.1 Gen que codifica para el FV

El gen que codifica para la proteína coagulante FV es un gen largo (>80 Kb) que se localiza en la región q21-q25 del cromosoma 1 [70]. Este gen ha sido clonado y caracterizado [71,72]. Posee 25 exones y 24 intrones (Figura 11) más los extremos 5' y 3' no traducidos. Los exones presentan tamaños variados que se encuentran en un rango entre 72-2820 pb.



Figura 11: Estructura del gen que codifica para el FV.

I 5.2 Funciones del FV

El FV es una glicoproteína plasmática larga y asimétrica. Es un componente esencial de la cascada de la coagulación [73,74], que puede actuar como proteína procoagulante o anticoagulante según se requiera en las distintas situaciones hemostáticas.

- El FVa junto con el FXa, en presencia de calcio y en contacto con superficies de membrana, forma el complejo protrombinasa. El FVa actúa como cofactor no enzimático aumentando unas 350.000 veces la eficacia catalítica de dicho complejo [73,75-80].(Figura 12)

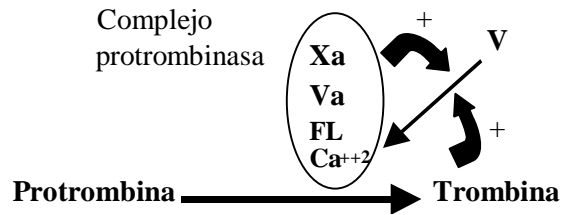


Figura 12: Acción del complejo protrombinasa en la activación de la trombina

Se ha observado que el FV en su forma no activada potencia la actividad anticoagulante de la PS, comportándose las dos proteínas como cofactores sinérgicos de la PCA en la degradación del factor VIIIa [69]. Por lo tanto, el FV en su forma inactiva presenta propiedades anticoagulantes. Recientemente se ha descrito que el FV en su forma activa es también un cofactor en el proceso de inactivación del FVIIIa por la PCA [69] (Figura 13).

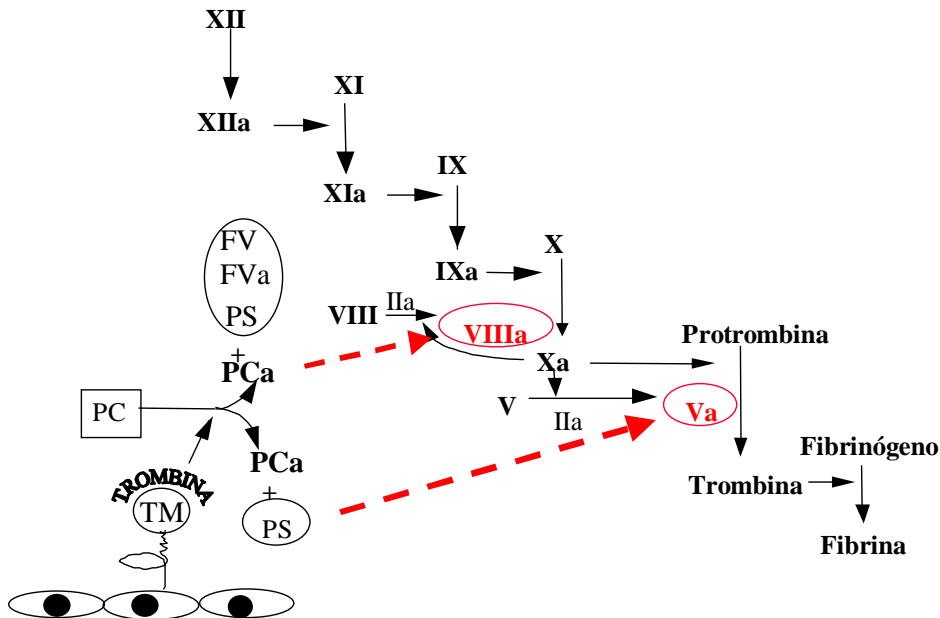


Figura 13: Función del FV en la cascada de la coagulación de la sangre.

Es decir, el FV juega un papel importante en la hemostasia como encargado de mantener de forma delicada el equilibrio anticoagulante y procoagulante de la sangre [81].

I 5.3 Estructura del FVa

El FV es un procofactor de cadena simple con un PM de 330.000. El FXa y/o la trombina son capaces de activar este procofactor a cofactor V activo [82].

El cofactor activo, FVa, fue purificado a partir de plasma humano, lo cual permitió conocer perfectamente la estructura del mismo. Está formado por una cadena pesada (PM = 105.000) que mantiene el extremo NH₂ terminal del procofactor (residuos 1-709 y dominios A1-A2), y una cadena con el extremo COOH terminal de la molécula del FV ligera (PM = 74.000) (aa 1546-2196, dominios A3-C1-C2) [71,83], las cuales no están unidas de forma covalente (Figura 14).

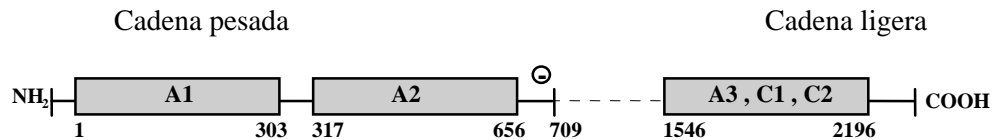


Figura 14: Estructura de FVa.

El FVa es inactivado por la acción proteolítica de la PCA a nivel de la cadena pesada [84,85], proteólisis que de manera secuencial rompe los enlaces Arg⁵⁰⁶, Arg³⁰⁶ y Arg⁶⁷⁹ [86,87]. Este mecanismo de inactivación es una proteólisis ordenada y secuencial en el que la rotura a nivel de la Arg⁵⁰⁶ es necesaria para una óptima exposición del resto de los aas diana (Arg³⁰⁶ y Arg⁶⁷⁹), [88,89]. Tras la proteólisis de la cadena pesada de FVa a nivel de la Arg⁵⁰⁶, nos encontramos ante dos fragmentos de PM = 75.000 y PM = 28/26.000. Posteriormente se procederá a la lisis en Arg³⁰⁶ y Arg⁶⁷⁹, dando así tres fragmentos de PM = 45.000, PM = 30.000 y PM = 22/20.000. Este sería el proceso normal de inactivación del FVa, controlándose así su acción procoagulante [90] (Figura 15).

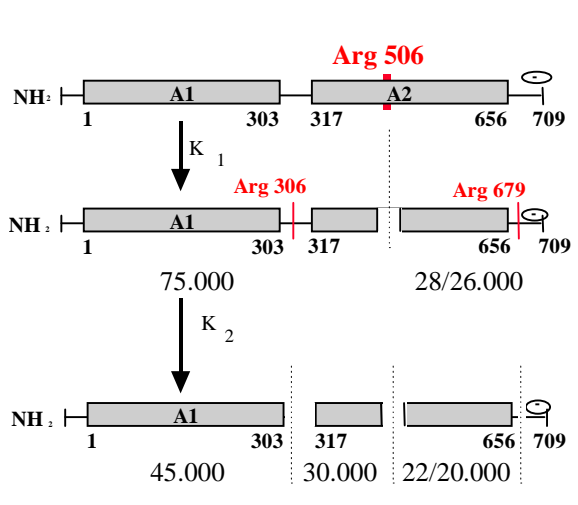


Fig 15:

Lisis de la cadena pesada del FVa Arg⁵⁰⁶.

“K” hace referencia a la velocidad de inactivación. ($K_1 > K_2$)

I 5.4 FV Leiden

La mutación FV Leiden consiste en una sustitución de una guanina por una adenina en posición 1691. La base 1691 se encuentra en el exón 10 del gen que codifica para la proteína. Según la secuencia definida por Jenny y colaboradores (nº de secuencia M16967 del Genbank), el exón 10 está constituido por 215 nucleótidos (nt). El primer nt sería el nº 1487 y el último nt el 1701 [71] (Figura 16).

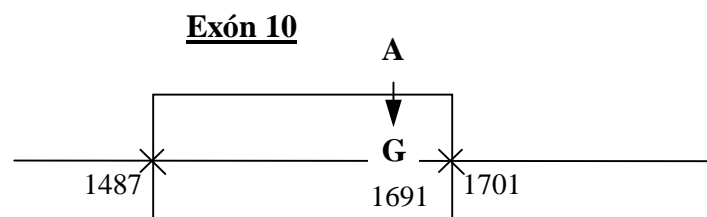


Figura 16: Mutación FV Leiden.

El aa 506 al que dará lugar el triplete de la secuencia normal, CGA, es la arginina (R). En caso de estar afectado por la mutación, el nuevo triplete CAA dará una glutamina (Q). En esta nueva situación la PCA no reconoce ese punto de corte en posición 506 por lo que sigue buscando las siguientes dianas (Arg³⁰⁶ y Arg⁶⁷⁹). Tras finalizar la proteólisis resultan 2 fragmentos de PM = 45.000 y PM = 56/54.000. La trascendencia fisiológica de esta mutación reside

en que la velocidad de inactivación en estas condiciones es claramente más lenta que la observada en el FVa normal [90] (Figura 17).

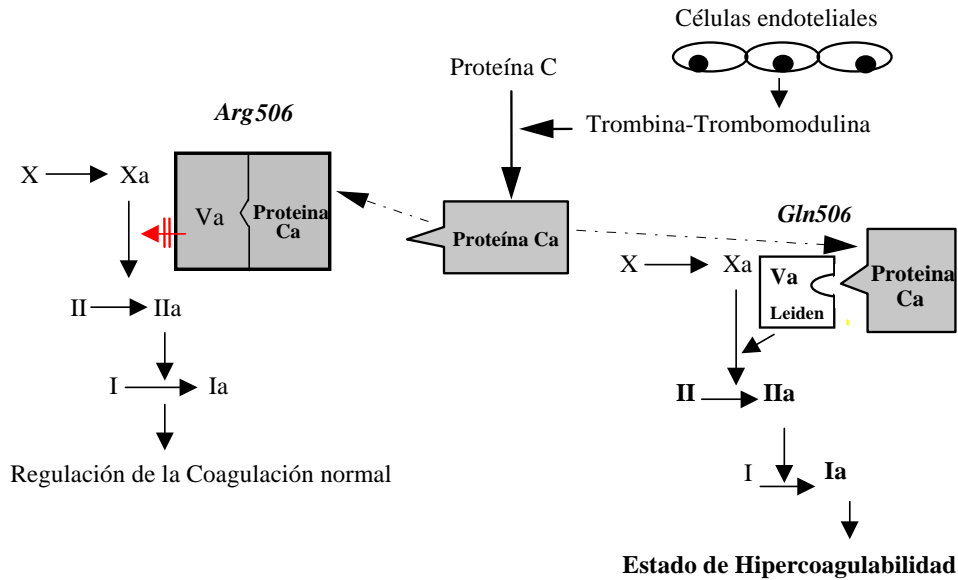


Figura 17: Esquema del desequilibrio causado por la mutación FV Leiden en la vía de la coagulación que genera una mayor producción de trombina y, por tanto, una capacidad anormalmente alta de síntesis de fibrina.

Gln⁵⁰⁶ no es insensible a la PCA pero es 10 veces menos sensible que Arg⁵⁰⁶ FVa. Por tanto, aunque la proteólisis en Arg⁵⁰⁶ consigue inactivar al FVa, no es eficiente por ser 10 veces más lenta sin la previa rotura de Arg⁵⁰⁶ [91,92]. La PCA presenta una velocidad de actuación normal en todos los casos (FV normal, FVa normal, FV Leiden) excepto con FVa Leiden [92] (Figura 18).

Heeb y cols en 1995 [91] confirmaron que la resistencia a la proteína C activada presentada por la mutación FV Leiden era independiente de que la activación del cofactor FV Leiden fuera realizada por el FXa o por la trombina.

Figura 19: Representación esquemática del efecto protrombótico de FV Leiden en la coagulación de la sangre, el sistema fibrinolítico y el sistema anticoagulante de la PC. Los signos más (+) y menos (-) denotan el incremento o decremento, respectivamente, de la actividad. Figura tomada de Zöller y cols. [99].

I 5.5 Epidemiología del FV Leiden

La prevalencia de la mutación FV Leiden entre la población sin trombosis varía en función del grupo étnico y del área geográfica considerados. Hay razas en las que este polimorfismo no está presente, como las poblaciones africana, asiática e indígena americana [100-103], mientras que en la raza caucásica parece oscilar entre un 2-7% [104,105]. Es destacable el dato que ofrece la población turco-chipriota, ya que es la cifra más elevada descrita con una prevalencia de 12,2% [106]. En España se encuentran cifras muy diversas, dependiendo de la región [107,108].

La prevalencia de dicha mutación entre los pacientes con trombosis venosa oscila entre el 20% y el 50% según los criterios de selección de pacientes empleados en los distintos estudios [63,64,108,109].

I 5.6 Importancia de la mutación FV Leiden

Por los datos descritos en el anterior párrafo, resulta obvio que la mutación del gen del FV parece ser el defecto genético asociado con enfermedad trombotica más prevalente descrito hasta el momento. Gracias a su descubrimiento, y junto con los defectos hereditarios previamente descritos, (PC, PS, ATIII), se puede detectar una alteración congénita en el 25-50% de los casos de TEV [64,110].

A diferencia de los defectos genéticos múltiples para un mismo fenotipo observados en los casos de déficits de ATIII, PC y PS, en la resistencia a la PCA una única mutación puntual del FV basada en la sustitución de una base explica más del 90% de los casos de la citada resistencia a esta acción anticoagulante [111]. Recientemente se han descrito otras mutaciones en el gen del FV en estudios de trombofilia familiar que parecen explicar algunos casos de RPCA sin presencia de la mutación R506Q [112,113].

En los últimos tiempos parece evidente el origen multigénico de la trombosis. En otras palabras, una única mutación no siempre es suficiente para desencadenar el proceso trombótico. En esta línea, se han descrito familias con defectos múltiples, fundamentalmente FV Leiden y otro defecto [43,44,114-118]. Esta asociación sería la explicación de que una familia con presencia o ausencia de RPCA heredada conjuntamente con otro déficit parece más o menos susceptible de padecer trombosis, respectivamente. De todos modos, aunque esta hipótesis está parcialmente probada, todavía quedan familias sin una respuesta clara a su tendencia trombótica, probablemente debido a que existen defectos congénitos que todavía no se han caracterizado [119]. Volviendo al FV Leiden, si dicha mutación no se ve asociada con otros defectos genéticos o factores de riesgo circunstanciales, los eventos trombóticos podrían no presentarse hasta una edad avanzada, o quizá jamás.

Como la prevalencia de esta mutación viene a ser entre 2-7% en el Oeste de Europa, un individuo entre mil sería candidato a presentarla de forma homocigótica. La homocigosidad para FV Leiden es clínicamente menos agresiva que las deficiencias de ATIII, PC y PS (probablemente incompatible con la vida en el primer caso y con un cuadro clínico de trombosis muy severa en los otros dos casos [120,121], aunque los pacientes portadores de dos alelos FV R506Q presentan un riesgo trombótico entre 30 y 140 veces superior al de los individuos sin mutación. En heterocigosis, el FV Leiden incrementa el riesgo entre 6 y 8 veces. Volviendo a la asociación de defectos, el riesgo trombótico se incrementa cuando esta mutación va acompañada de algún otro factor, ya sea genético o adquirido (embarazo, cirugía, inmovilización, toma de anticonceptivos orales.... [122].

I 6. POLIMORFISMO G20210A DEL GEN DE LA PROTROMBINA

En 1996, Poort y colaboradores investigaron el gen de la protrombina como candidato para albergar mutaciones que predispusieran al TEV [29,123,124]. El objetivo de este estudio fue analizar el gen de la protrombina de sujetos seleccionados con historia familiar de trombosis, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de las regiones codificantes y de las regiones flanqueantes 5' y 3'. Estos extremos son secuencias no traducidas [125], pero parecen jugar un papel importante en la regulación de la expresión de este gen. Como resultado del estudio, describieron un polimorfismo en el gen de la protrombina que creían condicionaba un incremento de riesgo trombótico [124], como veremos más adelante.

I 6.1 Protrombina y gen que la codifica

El FII o protrombina es una glicoproteína PM=72.000 daltons [126], presente en la sangre a una concentración aproximada de 1,5 μ M y con una vida media de alrededor de tres días [127]. Como la mayoría de las proteínas plasmáticas, la protrombina es sintetizada en las células del parénquima hepático [128]. Es una proteína vitamino K dependiente, es decir, necesita vitamina K para ejercer su acción adecuadamente. Sin la acción de esta vitamina liposoluble el FII que se sintetiza tiene una actividad muy disminuida. Consta de una sola cadena polipeptídica de aa [129], cuya secuencia completa ya ha sido descrita [125]. Estructuralmente puede ser dividida en dos partes con aproximadamente la misma masa. La mitad aminoterminal, denominada fragmento 1,2 (F1+2), contiene 273 aa y dos cadenas de oligosacáridos unidas a los residuos Asn 78 y 100. Su PM es aproximadamente 35.000 daltons [130]. Este fragmento presenta dos estructuras en forma de lazo o "kringle". La función de estos módulos "kringle" no está clara, pero podrían ser importantes para la formación del complejo de la proteína con el FV [131]. La otra mitad, denominada

protrombina 2, que corresponde al extremo carboxiterminal, es la precursora de la trombina. Contiene unos 306 aa y una cadena oligosacárida en un residuo Asn con un PM de 38.000 [132] (Figura 20).

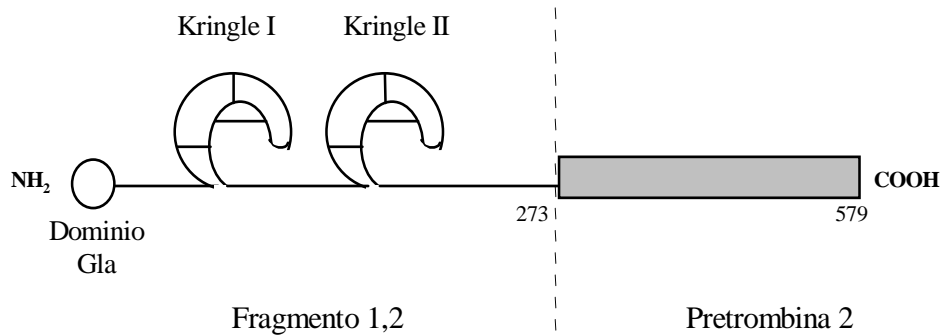


Figura 20: Estructura de la protrombina.

El gen que codifica para la protrombina está localizado en el cromosoma 11, tiene una longitud de 21 Kb y está compuesto de 14 exones, cada uno de los cuales es responsable de la expresión de todos o parte de los dominios funcionales de la protrombina [125] (Figura 21). El ARNm al que da lugar tiene 2,1 Kb e incluye una región 5' no traducida, una secuencia de lectura y una región 3' no traducida de 97 pb [131].

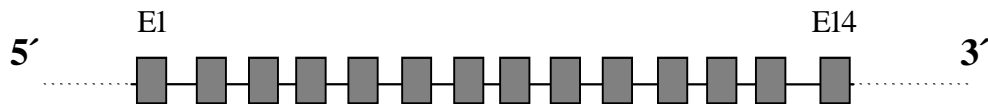


Figura 21: Estructura del gen que codifica para la protrombina.

I 6.2 Funciones del Factor II

La protrombina no tiene actividad coagulante en su forma de zimógeno y debe ser transformada a trombina (FIIa). Esta conversión está mediada por el complejo protrombinasa, anteriormente mencionado.

La trombina presenta complejas funciones en los sistemas coagulante, anticoagulante y fibrinolítico.

- Coagulante por ser la enzima capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, el FVIII a FVIIIa, el FV a FVa y el FXIII a FXIIIa.
- Anticoagulante por ser importante en la activación de la proteína C la cual inhibe la acción coagulante del FVa y del VIIIa.
- Fibrinolítica porque la PCA forma complejos con el PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno).
- Acción antifibrinolítica por activar el TAFI (Inhibidor de la fibrinólisis por impedir la formación acelerada de plasmina).

I 6.3 Polimorfismo G20210A

Este polimorfismo consiste en el cambio de una guanina por una adenina (G→A) en el nucleótido de posición 20210 del gen perteneciente a la región 3' no traducida del mismo (Protrombina G20210A) (Figura 22).

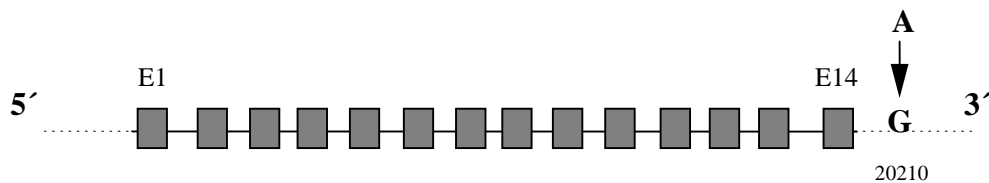


Figura 22: Sustitución de una Guanina por una Adenina en posición 20210.

Una vez expuesto que este polimorfismo es una mutación puntual localizada en el extremo 3' no traducido del gen, podemos confirmar que la proteína coagulante protrombina de un individuo afectado por 20210A es estructuralmente y funcionalmente idéntica a la de un individuo no afecto. Sin embargo, Poort y colaboradores comprobaron que este polimorfismo parecía estar significativamente más presente en los pacientes con TEV que en la población control. Investigando las posibles causas, encontraron diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de protrombina en individuos con genotipo normal 20210 GG (1,05 U/ml) y los individuos con genotipo 20210 AG que presentaban niveles aumentados (1,32 U/ml) [124]. Este incremento

en la concentración de protrombina en plasma podría por tanto ser el factor de riesgo de trombosis venosa. El mecanismo de acción no estaba claro, pero quizá se provocara un desequilibrio entre los sistemas procoagulantes, anticoagulantes y fibrinolíticos debido a una elevada generación de trombina, que sería la causante de un aumento en la generación de fibrina y, consiguientemente, del riesgo de trombosis.

La causa de la asociación entre el polimorfismo Protrombina G20210A y elevados niveles de la proteína en plasma no se conoce completamente, pero parece ser que el cambio de una base en la región 3' no traducida podría suponer una mayor eficiencia de transcripción o una superior estabilidad del ARNm transcrito [124].

I 6.4 Epidemiología de G20210A

La prevalencia de G20210A parece depender, al igual que en el caso del FV Leiden, de la etnia y distribución geográfica elegida en los distintos estudios. En el citado estudio de Poort y colaboradores [124] se observaba que la prevalencia de la mutación en la población general era del 2,3%, si bien en estudios posteriores se comprobó que varía según el área geográfica considerada.

Varios estudios apoyan la hipótesis de que este polimorfismo no se encuentra presente entre las razas no caucásicas. No se ha observado entre asiáticos, indios americanos ni raza negra [133-136].

Sin embargo, los estudios realizados en Europa oscilan entre un 1% y un 4% de prevalencia entre la población control [124,137-140]. Roseendal y colaboradores observan una mayor tendencia a portar el polimorfismo en el sur de Europa (3%) que en el norte (1,7%) [134]. Entre la población española, las cifras de prevalencia que se han publicado son muy variadas. En Murcia, Corral y cols. describen un 1,4% de portadores a diferencia de JC Souto y cols. en Barcelona que obtienen hasta un 6,5% en sujetos sanos. En un estudio realizado recientemente en Oviedo, M. Vargas y cols obtienen una cifra intermedia (3,5%)[141-143].

La prevalencia entre pacientes de TEV varía mucho en función de la selección realizada. Poort y cols, en el estudio inicial, encontraron un 18% de portadores en una población seleccionada con historia familiar trombótica (n=28) o un 6,2% si ampliaban el estudio con 471 pacientes sin seleccionar [124]. En cualquier caso, este polimorfismo parecía ser una de las causas más frecuentes de trombofilia hereditaria junto al FV Leiden. Estudios posteriores han publicado prevalencias que varían entre el 5% y el 19% en pacientes sin seleccionar, [140,144,145] oscilando alrededor del 15% en pacientes muy seleccionados con TEV e historia familiar de TEV o una alteración hereditaria asociada con trombofilia ya diagnosticada [146]. En España se barajan también cifras muy dispares en el campo clínico. Los valores de prevalencia hallados en las distintas regiones oscilan entre el 9,5% y el 17,2%. [141-143,147].

I 6.5 Importancia de G20210A

La presencia del alelo 20210A parece constituir un factor de riesgo trombótico. Los portadores heterocigotos para este polimorfismo presentan un riesgo entre 2 y 4 veces superior al de los individuos no afectados por el mismo [140,144], y en ocasiones presentan otros factores de riesgo asociados [146]. No existen muchos estudios publicados sobre portadores de forma homocigótica. Poort y cols calcularon que la prevalencia esperada de casos homocigotos 20210AA era un 0,014% [124] por lo que realizar estudios con individuos que cumplan estos rasgos genotípicos es realmente difícil. De los cuatro estudios publicados (1 ó 2 casos de portadores homocigotos por estudio), tres describen pacientes que han sufrido embolismo pulmonar masivo, trombosis venosas de repetición o episodios trombóticos severos de forma espontánea [148], [149,150]. Sin embargo, también se ha descrito un individuo homocigoto de 72 años asintomático, accidentalmente descubierto durante un estudio familiar [151].

II. Hipótesis y objetivos

La trombosis venosa es una enfermedad que afecta anualmente a uno por cada mil individuos. La naturaleza multifactorial de esta enfermedad es evidente debido a la continua identificación de factores de riesgo adquiridos y/o genéticos en los pacientes con trombosis.

Desde que en 1965 se describió el primer defecto genético causante de trombofilia congénita (déficit de AT III) [152] hasta hoy, el conocimiento sobre estas alteraciones ha aumentado de una manera considerable [40]. El gran paso fue el descubrimiento en 1993 de la resistencia a la proteína C activada [62] de origen hereditario, la cual es la anomalía más prevalente hasta ahora entre pacientes con tendencia trombótica. También ha sido importante el descubrimiento, más reciente, del polimorfismo G20210A en el gen de la protrombina [124].

Aunque en los últimos años se han logrado avances muy importantes en el campo de la trombofilia hereditaria, aún está pendiente de dilucidar en su totalidad la relación entre la existencia de un estado trombofílico hereditario y sus consecuencias clínicas [29]. Se hace necesario profundizar en esta línea para llegar a entender la razón que explique el hecho de que algunos individuos heterocigotos para una determinada mutación pueden estar asintomáticos toda la vida mientras otros presentan una expresión clínica severa.

Por este motivo nos planteamos realizar el presente trabajo en un intento de esclarecer el mayor número posible de aspectos relacionados con los dos factores de riesgo FV Leiden y Protrombina G20210A, de trombofilia hereditaria más comunes en Occidente, así como de aportar información acerca de su presencia y agresividad dentro de nuestro medio.

Así, nuestros objetivos fueron los siguientes:

1. Establecer la prevalencia de FV Leiden y Protrombina G20210A en la población control, así como en la población oriunda de Navarra.
2. Establecer la prevalencia de ambas mutaciones en una población de

pacientes con TEV.

3. Estimación del riesgo relativo de sufrir trombosis asociado a cada una de las dos mutaciones.
4. Observar la posible asociación de ambos defectos genéticos con otros factores de riesgo de origen adquirido o congénito.
5. Establecer si estas mutaciones predisponen a experimentar el primer episodio trombótico a una edad temprana.
6. Establecer si ambas mutaciones incrementan el riesgo de recurrencia trombótica.
7. Analizar el efecto combinado en el caso de los individuos portadores de ambos defectos genéticos (FV Leiden y Protrombina G20210A).
8. Profundizar en el mecanismo patogénico por el que el alelo 20210A del gen de la protrombina provoca un estado de hipercoagulabilidad.

III. Material y métodos

III 1. MATERIAL

III 1.1 Extracción ADN

- Suero fisiológico (Braun, España)
- Lymphoprep (Nycomed, Noruega)
- Proteínasa K (Boehringer Mannheim, Alemania)
- Fenol equilibrado en Tris pH=8 (Amersham, Cleveland, EEUU)
- Cloroformo (Sigma, St. Louis, EEUU)
- Alcohol isoamílico (Sigma, St. Louis, EEUU)
- Etanol absoluto (Oppac, España)
- Espectrofotómetro modelo DU[®] 70 (Beckman, EEUU)
- Desecador (Nalgene, Nueva York, EEUU)
- Centrífuga, (Oppac, España)

Solución de lisis

- 0,25 µl Tris 1M PH=7.0
- 0,625 µl SDS 20%
- 1,25 µl EDTA 0,5M PH=8.0
- 22,875 µl de agua autoclavada

III 1.2 Detección de las mutaciones

- Deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) (Pharmacia Biotech, Inglaterra)
- Cloruro de magnesio (MgCl₂) (Promega, Madison, EEUU)
- Taq polimerasa recombinante (Boehringer Mannheim, Alemania).
- Agarosa (Hispanlab, España)
- Bromuro de etidio (Sigma; St. Louis, EEUU)
- Agarosa Nusieve (FMC; Rockland, EEUU)
- BSA (Biolabs, Inglaterra)

III 1.2.1 FV Leiden

- Enzima Mnl I (Biolabs, Inglaterra)

Cebadores: (Pharmacia Biotech, Inglaterra)

Cebador 5': 5'-TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA-3' (nt 1581-1602).

Cebador 3': 5'-TGTTATCACACTGGTGCTAA-3' (nt 127-146 del intrón 10).

III 1.2.2 G20210A

- Enzima Hind III (Pharmacia Biotech, Inglaterra)

Cebadores: (Pharmacia Biotech, Inglaterra)

Cebador 5': 5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3' (nt 19.889-19.908)

Cebador 3': 5'-ATAGCACTGGGAGCATTGAA-3' (nt 20.233-20.212)

III 1.3 Pruebas plasmáticas

- Coatest[®] APC Resistance V-S (Chromogenix, Suecia)
- Substrate plasma for factor II. Assay by STA[®] analyzers (Diagnóstica Stago, Francia)
- Enzygnost F1+2 micro (Dade Behring, Alemania)
- Enzygnost[®] TAT micro (Dade Behring, Alemania)
- Asserachrom Dímero D (Diagnostica Stago, Francia)
- Lector de microplacas IEMS Reader MF (Labsystems, Finlandia)
- Electra 1600C.(Izasa, España)

III 2. SUJETOS DE ESTUDIO

La población está formada por todas las muestras que se recogieron a lo largo del tiempo dedicado al estudio (septiembre 1996 – diciembre 1999). De ésta se seleccionarán casos de una forma más concreta para formar las otras poblaciones estudiadas.

III 2.1 Grupo control

La población control estudiada se compuso de 367 individuos sanos sin antecedentes de trombosis. La mayoría de estos sujetos se ofrecían para ser donantes de sangre en el Banco de Sangre de Navarra (Pamplona). También obtuvimos controles de otros centros hospitalarios, que acudían al centro para hacerse un chequeo. Sus edades oscilaban entre 18 y 65 años (156 hombres y 211 mujeres). Todos ellos fueron informados de los objetivos de este estudio, y de forma voluntaria aceptaron formar parte del mismo.

III 2.2 Grupo de Pacientes

Se estudiaron entre octubre de 1996 y diciembre de 1999, 204 pacientes, 109 hombres y 25 mujeres, de edades comprendidas entre 16 y 65 años. Eran pacientes consecutivos, no seleccionados y diagnosticados de TEV por métodos objetivos (flebografía, Eco-Doppler, gammagrafía de ventilación/perfusión o angiografía pulmonar), proporcionados por los siguientes hospitales: Hospital de Navarra, Hospital Virgen del Camino, Clínica Ubarmin y Clínica Universitaria de Navarra. Todos ellos habían sufrido al menos un episodio de TV.

III 2.3 Datos registrados

A los sujetos del grupo control se les realizó una entrevista con la finalidad de obtener los siguientes datos: sexo, edad, presencia de posibles factores de riesgo desencadenantes de enfermedad tromboembólica como obesidad (índice de masa corporal, $IMC = \text{peso(Kg)}/\text{altura}^2(\text{m})$), inmovilización (encamamiento y/o impedimento en la movilidad), neoplasia, cirugía, traumatismo, embarazo, puerperio (hasta 40 días tras el parto), anticonceptivos orales, antecedentes familiares de TEV.

Fueron considerados sujetos control para el estudio tras asegurarnos de que no hubiesen sufrido ningún episodio trombótico de localización venosa y/o arterial.

A los pacientes se les realizó una historia clínica donde constaban datos

similares a los del grupo control, y otros datos clínicos como antecedentes personales de TEV (recurrencia trombótica o primer episodio). Ante un caso de recurrencia se registraron el nº de episodios previos y la edad del paciente cuando sufrió el primer episodio. El cuadro clínico en el momento de recogida de muestras: TV en distintas localizaciones, siendo la mayoría en extremidades inferiores (TVP), embolismo pulmonar (EP), o ambas a la vez. También se registraron otras posibles trombosis de localización arterial: infarto agudo de miocardio (IAM), enfermedad arterial periférica (EAP) o accidente cerebrovascular (ACV). De la historia de los pacientes se recogían también las siguientes determinaciones: proteína C, proteína S, antitrombina III, fibrinógeno, plasminógeno y detección de anticuerpos antifosfolípido (anticoagulante lúpico y anticuerpos anticardioplipina (ACA)).

III 3. PARTES DEL ESTUDIO

III 3.1 Prevalencia de las mutaciones en la población control

III 3.1.1 En la población general

Se estudió en los 367 controles antes mencionados.

III 3.1.2 En la población navarra

Para estudiar la prevalencia de ambas mutaciones en una población navarra fue necesario realizar una selección de los sujetos control. Para que un individuo fuera considerado portador de genes navarros debía cumplirse la condición de que tanto los dos abuelos paternos como los abuelos maternos hubiesen nacido en Navarra. Encontramos 179 sujetos (68 hombres y 111 mujeres) de edades comprendidas entre 18 y 64 años que satisfacían esta condición.

III 3.2 Prevalencia de las mutaciones en el grupo de pacientes

Se analizaron los 204 pacientes antes mencionados.

III 3.3 Análisis de FV Leiden y Protrombina G20210A como factores de riesgo de TEV

III 3.3.1 Cálculo del riesgo relativo asociado a las mutaciones

El riesgo relativo asociado a las mutaciones se estimó con la *odds ratio* (O.R.). Para el cálculo de la O.R., se parearon 162 pacientes por sexo y edad con 352 controles (cada paciente al menos con un control) considerando los siguientes intervalos de edad: 15-19 años, 20-24, 25-29, 30-34, 35-39, 40-44, 45-49, 50-54, 55-59, 60-64 y 65-69.

Los sujetos a los que no se les encontró el correspondiente pareado en el otro grupo no fueron incluidos en este análisis.

III 3.3.2 Influencia de FV Leiden y Protrombina G20210A en la edad del primer episodio trombótico

Estudiamos la influencia de las dos mutaciones en estudio en el hecho de presentar un primer episodio de TEV a una edad más temprana.

III 3.3.3 Influencia de FV Leiden y Protrombina G20210A en la recurrencia

Estudiamos la influencia de las dos mutaciones en estudio en el hecho de sufrir una recaída trombótica.

III 3.4 Análisis de los posibles mecanismos fisiopatológicos de hipercoagulabilidad en la mutación G20210A de la protrombina

Con la intención de profundizar en el mecanismo de acción del polimorfismo G20210A, comparamos una serie de parámetros plasmáticos entre 12 pacientes que habían sufrido al menos un episodio trombótico y eran portadores del alelo mutado de forma heterocigota, y 12 pacientes que poseían el genotipo GG seleccionados para aparear con los anteriores en cuanto a sexo y edad. Esa misma comparación se realizó en el grupo control, entre 15 sujetos sanos portadores del alelo mutado y 15 controles no portadores.

III 4. MÉTODOS

III 4.1. Obtención de muestras biológicas

III 4.1.1 ADN

Para el análisis genético de las muestras se realizó una extracción de 10 ml de sangre total obtenida mediante venopunción en un tubo con EDTA tripotásico. El ADN fue extraído de las células sanguíneas de la serie blanca.

- Extracción de células de la serie blanca

Se realizó una centrifugación en gradiente de densidad. Para ello se diluía previamente la muestra de sangre al 50% en suero fisiológico dejando deslizar lentamente sobre la pared de un tubo de 10 ml que contenía 3 ml de Lymphoprep con mucho cuidado de mantener las dos fases. La centrifugación se llevó a cabo a temperatura ambiente, a una velocidad de 600 g_{max} durante 30 min. El halo intermedio con aspecto lechoso contenía las células nucleadas que nos interesaban. Con ayuda de una pipeta pasteur se aspiraron y se diluyeron en 6 ml de suero fisiológico. Se realizaron dos lavados de 10 min a 500 g_{max} , decantando posteriormente el sobrenadante.

Una vez aisladas, las células se resuspendieron en 100 μ l de suero fisiológico. En estas condiciones pueden ser congeladas a -80 °C hasta realizar el proceso de lisis.

- Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante la técnica de extracción de fenol-cloroformo-álcool isoamílico. Para ello fue necesario proceder primero a la lisis de las células, que consistió en incubar durante 1h los 100 μ l de suspensión celular con 25 μ l de solución de lisis y 25 μ l de la enzima proteinasa K a una concentración de 1 mg/ml.

Una vez lisadas las células, se añadió un volumen (150 μ l) de fenol-cloroformo-álcool isoamílico en proporción 25:24:1, y se centrifugó a 13.000 g_{max} durante 3 min.

El sobrenadante se pasó a otro tubo y se realizó un lavado con un volumen (150 μ l) de cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 24:1.

De nuevo se pasó el sobrenadante a otro tubo, y se añadieron 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 moles/L a pH=5,2 (15 μ l) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (500 μ l). El ADN precipitó de este modo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Posteriormente se centrifugó 30 min a 13.000 g_{max} quedando un botón de ADN que se lavó con 1 ml de etanol al 70% durante 10 min a 13.000 g_{max} . Una vez eliminado el sobrenadante, el ADN fue sometido a un proceso de deshidratación y rehidratación en agua autoclavada.

Posteriormente se procedió a la cuantificación espectrofotométrica del material genético obtenido.

Ya preparado, el ADN se almacenó a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

III 4.1.2 Plasma

Las muestras de sangre total fueron recogidas en tubos con citrato sódico (0,129 moles/L) asegurándonos siempre de que el sujeto a estudio no estuviese recibiendo tratamiento anticoagulante. Mediante centrifugación a 2.260 g_{max} a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min se separó el plasma, que fue congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alícuotas de 600 μ l hasta la realización de las pruebas.

III 4.2. Técnicas de biología molecular

Para el análisis genético de las muestras se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita por Mullis en 1987 [153]. Es una técnica muy sensible que se basa en la obtención de gran número de copias de una secuencia específica de ADN por replicación enzimática (Taq ADN polimerasa), gracias a la repetición cíclica de tres reacciones simples (desnaturalización, unión de los cebadores y extensión), cuyas condiciones sólo varían en la temperatura y tiempo de incubación. Las tres reacciones tienen lugar en el mismo tubo con reactivos termoestables, estando automatizados los pasos de cada ciclo en un aparato llamado termociclador.

Siguiendo esta metódica se estudiaron los genes de FV y protrombina. Se amplificaron las regiones que tuvieran en su secuencia la mutación buscada para alcanzar unas cantidades de ADN lo suficientemente altas para ser detectadas por electroforesis en gel de agarosa. Para la detección de dichas mutaciones se utilizaron enzimas de restricción cuyo punto de corte en la secuencia estudiada deja en evidencia un patrón de bandas distinto en el caso de un sujeto no portador que en el caso de un sujeto portador de la mutación en estudio.(Figura 23).

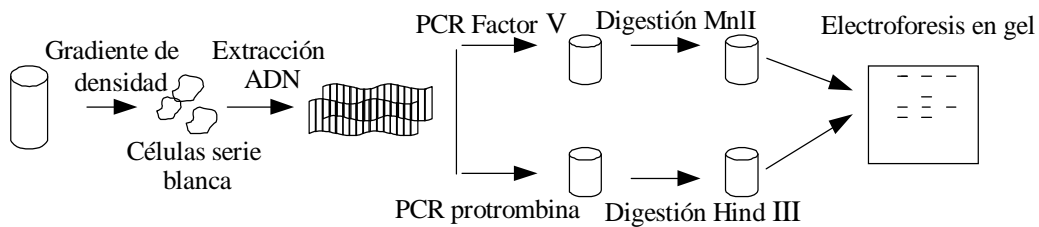


Figura 23: Proceso seguido para el estudio de las mutaciones FV Leiden y Protrombina G20210A.

III 4.2.1 Detección de la mutación FV Leiden

Se realizó utilizando los cebadores descritos por Bertina y cols.[4]. Estos cebadores (código de acceso al GenBank L32764) tienen una longitud óptima, de 20 a 22 nt, y amplifican un fragmento de 267 pb que contiene la mutación a estudiar. El cebador 5' comienza en el nt 95 del exón 10 y tiene un tamaño de 22 nt. El cebador 3' comienza en el nt 127 del intrón 10 y tiene un tamaño de 20 nt (Figura 24).

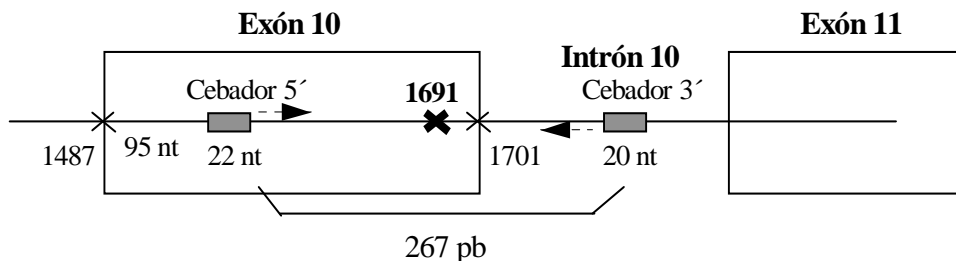


Figura 24: Fragmento amplificado en la PCR de FV.

Cebadores:

Cebador 5': 5'-TGCCAGTGCTTAACAAGACCA-3' (nt 1581-1602).

Cebador 3': 5'-TGTTATCACACTGGTGCTAA-3' (nt 127-146 del intrón 10).

Condiciones de la PCR

50 µl de mezcla conteniendo 0,7 µg de ADN, 0,3 mM de dNTPs, 0,5 µM de cebadores, 13 mM de MgCl₂ y 2 Unidades de Taq polimerasa recombinante fueron sometidos a 36 ciclos (95 °C durante 40 s, 55 °C durante 40 s y 72 °C durante 1 min).

Para visualizar el producto de PCR se utilizaron alícuotas de 8 µl que fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1% con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio durante 20 min a 100 voltios (V). La exposición del gel a luz ultravioleta (UV) permitió observar las bandas de PCR por unión del bromuro de etidio a los nucleótidos. A continuación el fragmento amplificado de 267 pb fue digerido con la enzima de restricción Mnl I

Condiciones de la digestión

7 µl de PCR y 3,5 unidades de encima Mnl I fueron incubados durante 2 h. Para visualizar el producto de la digestión se llevó a cabo una electroforesis con un gel de agarosa Nusieve al 3,5% durante hora y media a 60 V. El producto se visualizó mediante bromuro de etidio y luz UV.

MnlI reconoce dos puntos de corte en la secuencia normal del FV [4] por lo que el fragmento normal 1691G, de 267 pb, tras la digestión dará fragmentos de 163, 67 y 37 pb. Sin embargo, la secuencia mutada 1691A pierde una diana de restricción para Mnl I en posición 1691, resultando así dos fragmentos de 200 y 67 pb, que originarán un patrón de bandas fácilmente diferenciable del normal tras la electroforesis (figura 25).

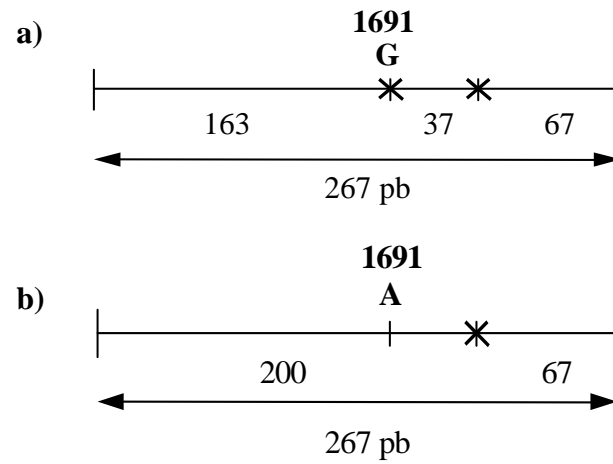


Figura 25: a) Secuencia normal 1691G tras la digestión con Mnl I. b) Secuencia mutada 1691A tras la digestión con Mnl I.

La imagen observada en el gel de agarosa nos fue la siguiente: (Figura 26)

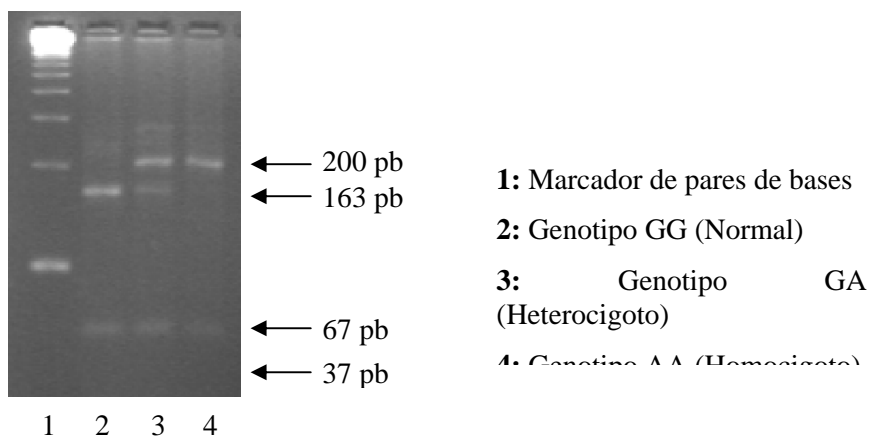


Figura 26: Posibles patrones de bandas tras la digestión con Mnl I.

Condiciones de la digestión

8 µl de producto de PCR y 20 unidades de encima Hind III fueron incubados durante 2 h. Para visualizar el producto de digestión se llevó a cabo una electroforesis con un gel de agarosa Nusieve al 3,5%, durante 2 h a 60 V. El producto se vio mediante bromuro de etidio y luz UV.

Esta enzima encuentra un punto de corte solamente en la secuencia 20210A [124] por lo que el fragmento normal 20210G de 345 pb continuará como un solo fragmento tras la digestión, a diferencia de la secuencia 20210A que dará lugar a dos fragmentos de 322 y 23 pb (La imagen observada en el gel de agarosa nusieve es la siguiente: (Figura 28)

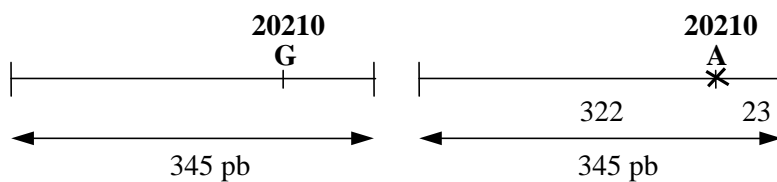


Figura 28: Secuencias normal y mutada del gen del factor II tras la digestión con HindIII.

La imagen observada en el gel de agarosa nusieve fue la siguiente: (Figura 29)

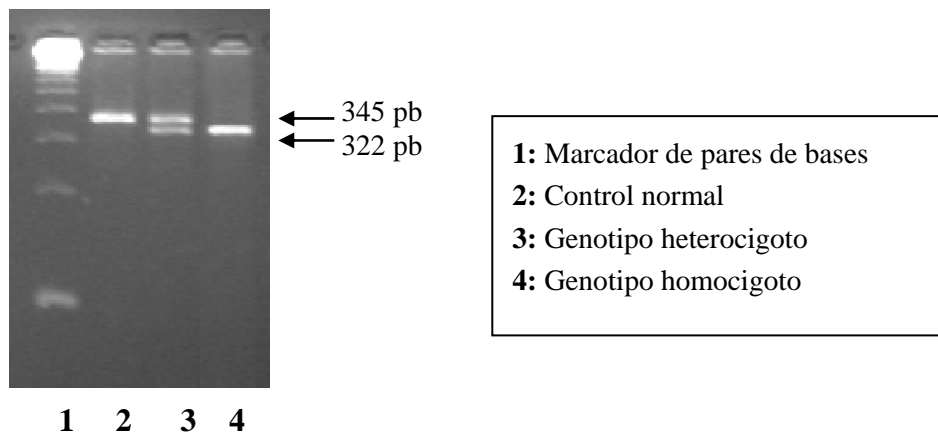


Figura 29: Posibles patrones de bandas tras la digestión con HindIII.

III 4.3. Técnicas funcionales plasmáticas

III 4.3.1 Resistencia a la proteína C activada.

Para detectar una posible pobre respuesta a la acción anticoagulante de la PCA se realizó una prueba clásica en hemostasia, llamada “tiempo de tromboplastina parcial activada” [62].

Esta prueba consiste en añadir al plasma problema un activador de la vía intrínseca de la coagulación, cronometrándose el tiempo transcurrido entre la adición del activador y la formación del coágulo. Es evidente que la PCA debería, en condiciones normales, retrasar el tiempo de formación del coágulo, debido a su potente acción anticoagulante. Sin embargo, la adición de PCA tendrá un efecto mucho menor sobre un sujeto con FV Leiden, debido a la resistencia de éste a su acción anticoagulante. Por lo tanto, el cociente (*ratio*) entre el TTPA con PCA y el TTPA sin PCA estará anormalmente reducido en los plasmas de los sujetos portadores de la mutación.

El test original tiene una alta sensibilidad y especificidad para detectar la mutación FV Leiden [4,111]. El método, una vez comercializado, ha demostrado poseer una excelente reproducibilidad [155] y un alto valor predictivo positivo [156]. Su especificidad es del 98% y su sensibilidad del 76% [157].

Este test fue modificado con el fin de aumentar el valor diagnóstico del ensayo plasmático. Jorquera propuso prediluir, previamente a la realización del test, el plasma problema en plasma deficiente en factor V [158]. Esta variante permite estudiar plasmas de pacientes con tratamiento anticoagulante oral [159,160], y aumenta la sensibilidad y especificidad para la detección del FV Leiden prácticamente hasta el 100% [161,162], aunque algunas modificaciones comerciales basadas en estos métodos poseen especificidades algo inferiores [163,164].

Reactivos

Se utilizó el test modificado según la propuesta de Jorquera, Coatest[®]

APC Resistance V-S (Chromogenix, Suecia).

Técnica

Todos los reactivos debían encontrarse a temperatura ambiente antes de ser usados. Se añadió un volumen de plasma previamente diluido (1:5) en plasma deficiente en FV (1 volumen de muestra + 4 volúmenes de plasma deficiente en FV) y un volumen igual de reactivo APTT a una cubeta. Posteriormente se añadió un volumen igual de CaCl₂ previamente incubado a 37 ± 0,5 °C y se cronometró el tiempo de coagulación. En un segundo ensayo se añadía PCA/CaCl₂ a 37 ± 0,5 °C en vez de añadir CaCl₂.

Los resultados se obtuvieron calculando la *ratio*:

$$ratio = \frac{\text{Tiempo de coagulación (APC / CaCl}_2\text{)}}{\text{Tiempo de coagulación (CaCl}_2\text{)}}$$

Para establecer el límite (punto de corte) por encima del cual el valor sería considerado normal y por debajo del cual sería considerado patológico, se recogieron 21 muestras de sujetos sanos, con las que se hizo una mezcla que fue sometida al ensayo, obteniéndose un valor promedio de 2,00 ± 0,17 (media ± DE, n° de repeticiones = 10). Por este motivo establecimos el límite en 1,8 (valores inferiores a éste serían considerados patológicos).

III 4.3.2 Factor II coagulante

Se realizó mediante un ensayo que mide un tiempo de coagulación que es reflejo de los niveles de FII en las muestras problema [165].

El ensayo consistía en la medida del tiempo de coagulación del plasma problema añadiendo plasma deficiente en FII, pero con todos demás factores de coagulación presentes en exceso de forma constante. Así, el FII presente pertenecería a la muestra a estudiar.

Reactivos

Los proporcionados por el Kit comercial: Substrate plasma for factor II.

Assay by STA[®] analyzers. (Diagnostica Stago; Francia).

Técnica

El plasma problema se diluyó con una dilución 1:10 en tampón Owren-Koller en tubos de plástico especiales para el test (1 volumen de plasma + 9 volúmenes de tampón).

Todos los reactivos debían encontrarse a temperatura ambiente antes de ser usados. Se añadieron un volumen de plasma previamente diluido en tampón Owren-Koller y un volumen de plasma deficiente en Factor II. Tras dos minutos de incubación a 37 °C se añadió un volumen igual de neoplastina previamente incubada a 37 °C y se cronometró el tiempo de coagulación.

Los resultados se obtuvieron extrapolando los tiempos de coagulación obtenidos en una curva bilogarítmica. Esta curva representa en el eje x niveles estándar de FII (%) y tiempos de coagulación (segundos) en el eje y. El intervalo de referencia en sujetos sanos está entre 70 y 120%.

III 4.3.3 Fragmento 1+2 de la protrombina

Se determinó mediante un método inmunoenzimático (ELISA) siguiendo la metodología descrita por Pelzer y cols [55].

Se trata de una prueba inmunoenzimática basada en el principio de sandwich. Los pocillos de una placa de microtitulación están recubiertos por anticuerpo monoclonal frente al F1+2, a los que se une el F1+2 de la muestra durante una primera incubación. A continuación se añaden los anticuerpos contra protrombina humana conjugados con peroxidasa, que se unen a los determinantes F1+2 libres. Eliminados los anticuerpos excedentes conjugados mediante lavado, se añade el sustrato cromogénico (dihidroclorhidrato de orto-fenilendiamina, en solución que contiene peróxido de hidrógeno) sobre el que actuará la peroxidasa conjugada de los anticuerpos unidos. Parada la reacción se mide la intensidad cromática a 492 nm, siendo proporcional a la concentración de F1+2 de la muestra.

Reactivos

Este ensayo se realizó mediante el test comercializado, Enzygnost® F1+2 micro (Dade Behring; Alemania).

Técnica

Se añadieron 50 µl de solución de tampón que contiene seroalbúmina a los pocillos de la placa de microtitulación, que estaban recubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-F1+2. A continuación se pipetearon en cada pocillo 50 µl de estándares (de concentración conocida, para construir la curva patrón), plasma control o de muestra, incubando 30 min a 37 °C, y lavando la placa posteriormente tres veces con una solución Tris-cloruro de sodio con Tween 20. Seguidamente se añadieron 100 µl de anticuerpo anti-protrombina conjugado con peroxidasa, con una incubación de 25 min a 37 °C, lavando de nuevo tres veces y añadiendo 100 µl de la solución de cromógeno recién preparada. Incubada otros 15 min sin luz a 20-25 °C se paró la reacción, con lectura de la absorbancia a 492 nm en el término máximo de una hora.

Los resultados se obtuvieron extrapolando las absorbancias en una curva estándar calculada en papel milimetrado doble logarítmico con un margen de medida entre 0,04 y 10 nmol/L. El valor de referencia en un adulto sano es de 0,7 nmol/L (0,4/1,1 nmol/L).

III 4.3.4 Complejos trombina-antitrombina (TAT)

Se realizó mediante una técnica inmunoenzimática ELISA de acuerdo con la descrita por Pelzer y cols [57].

El método consiste en un enzimoimmunoensayo tipo sandwich, que emplea una placa de microtitulación con pocillos recubiertos de anticuerpo monoclonal anti-trombina. A estos anticuerpos se unen los complejos TAT de la muestra en una primera incubación y, a continuación se añaden los anticuerpos anti-AT III humana conjugados con peroxidasa, que se unen a los determinantes libres de AT III. Después de eliminar mediante lavado los anticuerpos excedentes conjugados con enzima, se añade el sustrato

cromogénico (dihidroclorhidrato de orto-fenilendiamina, en solución que contiene peróxido de hidrógeno), sobre el que actuará la peroxidasa conjugada de los anticuerpos unidos. Parada la reacción, se mide la absorbancia a 492 nm, que será proporcional a la concentración de TAT de la muestra.

Reactivos

Los proporcionados por el Elisa comercial Enzygnost® TAT micro. (Dade Behring; Alemania).

Técnica

Se añadieron secuencialmente 50 µl de solución de tampón y 50 µl de estándares, de control o de muestra a los pocillos de la placa de microtitulación, que estaban recubiertos con un anticuerpo monoclonal anti-trombina. Tras 15 min a 37 °C se realizaron tres lavados y se pipetearon 100 µl de solución de anticuerpo anti-AT III conjugado con peroxidasa. Tras otros 15 min a 37 °C y después de otros tres lavados, se añadieron 100 µl de la solución de cromógeno recién preparada. Incubada 30 min sin luz a 20-25 °C, se paró la reacción y se leyó la absorbancia a 492 nm en el término máximo de una hora.

Los resultados se obtuvieron extrapolando las absorbancias en una curva estándar calculada en papel milimetrado doble logarítmico con un rango de 2 a 60 µg/L. El límite de detección de este ensayo es de 0,5 µg/L y el intervalo de referencia en sujetos sanos está entre 1,0 y 4,1 µg/L.

III 4.3.5 Determinación del dímero-D

Se determinó mediante un enzimoimmunoensayo (ELISA) de tipo sandwich, con metodología similar a la descrita por Amiral y cols [166].

Se trata de una técnica inmunoenzimática en placa de microtitulación con los pocillos recubiertos por un anticuerpo específico frente al dímero D, a los que se une el dímero D de la muestra. A continuación se añaden anticuerpos anti-PDF-D marcados con peroxidasa, que se unen a otro determinante antigénico del dímero D formando complejos tipo sandwich. El antígeno secundario no ligado se elimina por lavado, y tras la adición del

sustrato cromogénico, la actividad de la peroxidasa ligada es determinada fotométricamente a 492 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de dímero D de la muestra.

Reactivos

Los contenidos en el envase Asserachrom Dímero D (Diagnóstica Stago).

Técnica

En primer lugar se realizó una dilución de una parte de plasma citratado con 20 partes de solución tampón con albúmina, fosfato y Tween 20. A continuación se pipetearon en los pocillos 200 µl de estándar, control o muestra y se incubaron una hora a temperatura ambiente (15-25 °C). Lavados cinco veces con 250 µl de una solución de cloruro sódico y Tween 20, se añadieron 200 µl del conjugado peroxidasa-anti-PDF-D. De nuevo se incubaron una hora y lavaron y, posteriormente, se añadió el sustrato cromogénico (orto-fenilendiamina y peróxido de urea). Tras exactamente 3 min, se paró la reacción con ácido sulfúrico. La lectura de las absorbancias se inició pasados 10 min, y en el plazo máximo de 2 h a 492 nm.

Los resultados se obtuvieron extrapolando las absorbancias en una curva estándar calculada en papel milimetrado doble logarítmico. El valor de referencia considerado normal es el inferior a 500 ng/mL.

III 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron registrados en una base de datos confeccionada en la hoja de cálculo Excel 7.0 y fueron analizados con el apoyo de los paquetes estadísticos SPSS 9.0 (versión Windows) y Stata 5.0.

III 5.1 Estadística descriptiva

Se realizó un estudio descriptivo tanto en variables cuantitativas como

cualitativas para determinar las características de cada una de ellas.

VARIABLES CUANTITATIVAS:

Fueron sometidas al test de normalidad Kolmogorov-Smirnov.

- Media \pm Desviación estándar (distribución normal).
- Mediana \pm Rango intercuartílico (distribución no normal).
- Rango.

La variable obesidad fue tratada como Índice de Masa Corporal (IMC) según la fórmula:

$$IMC = \frac{Peso (Kg)}{Altura^2 (m)}$$

La frecuencia alélica es calculada utilizando la siguiente fórmula:

Frec. Alélica=[Nº sujetos homocigotos+Nº sujetos heterocigotos/2]/Nº total de sujetos

VARIABLES CUALITATIVAS:

- Frecuencias absolutas.
- Proporciones.
- Porcentajes.

En ocasiones la variable obesidad fue transformada en cualitativa (sobrepeso), utilizando como punto de corte el valor $IMC > 25$.

III 5.2 Estadística inferencial

Comparación de medias

Test de U de Mann Whitney en el caso de variables que no se distribuyen de forma normal (edad de primer episodio trombótico), previamente realizado el test de Kruskal-Wallis en caso de comparar más de dos muestras independientes.

Análisis de regresión logística univariante y multivariante.

La función de la O.R. es medir o estimar la asociación entre un

determinante y la enfermedad o desenlace con el que se relaciona. Cuanto más alta es la O.R., mayor es la fuerza de la asociación entre esa enfermedad y su determinante [167].

Para poder calcular la O.R. de cada una de las mutaciones, primero calculamos el riesgo que parece suponer cada una de las variables estudiadas. Para ello analizamos los datos mediante una regresión logística condicional univariante (para datos pareados). Así conseguimos la O.R. cruda, es decir, el riesgo que parece suponer cada variable sin contemplar la posible influencia del resto. Con el estudio multivariante se pretende eliminar todo el “ruido de fondo” de los demás factores de riesgo para poder determinar así el riesgo relativo atribuible únicamente a la presencia de la mutación FV Leiden.

Los resultados de la citada estadística univariante nos permiten seleccionar los factores de riesgo a incluir en el modelo multivariante (p de significación estadística $< 0,25$). Al analizar los datos con regresión logística condicional multivariante (para datos pareados) obtendremos una estimación del riesgo relativo de TEV achacable, ahora sí, sólo a cada una de las variables en estudio (p de significación $< 0,05$).

Análisis de asociación (mutación-factores de riesgo)

El análisis de la asociación entre cada una de las dos mutaciones en estudio con el resto de factores de riesgo trombótico se analizó mediante regresión logística (ajustada por la variable edad) en el grupo de pacientes. Estos resultados (O.R.) se interpretan respecto a un valor de referencia (valor 1). Todas las variables en este tipo de análisis se tratan como cualitativas binarias (presencia/ausencia del riesgo), asignándose el valor 1 en todos los casos a la ausencia del factor de riesgo analizado.

Estudio de la influencia de las mutaciones en la edad del primer episodio trombótico

Este análisis estadístico se realizó mediante una regresión lineal múltiple

por ser cuantitativa la variable dependiente (edad al sufrir el primer episodio trombótico).

Estudio de la influencia de las mutaciones en la recurrencia

Este análisis estadístico se realizó mediante regresión logística por ser cualitativa la variable dependiente (recurrencia).

También se repitió ajustando por edad ya que una persona joven, lógicamente, no ha tenido la misma oportunidad de recurrir que una persona de edad más avanzada.

Mecanismos fisiopatológicos de hipercoagulabilidad en la mutación G20210A de la protrombina

Se analizaron mediante un ANOVA de dos criterios. Los resultados son dos probabilidades asociadas a cada uno de los dos criterios, cuya interpretación depende de una tercera probabilidad asociada a la interacción entre ambos.

III 6. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

Las bases de datos bibliográficos en soporte informático más frecuentemente utilizadas fueron:

- *MEDLINE*[®] (U.S. National Library of Medicine), por medio del software *WinSPIRS*[™] 2.0
- *Life Sciences* (Institute for Scientific Information[®], Inc.) por medio del software *Current Contents*[®] 1.3

Así mismo, se consultó la base de datos bibliográfica de acceso a través de Internet PubMed (U.S. National Library of Medicine), cuya dirección URL es: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>

IV. Resultados

IV 1. PREVALENCIA EN LA POBLACIÓN CONTROL

IV 1.1 Prevalencia en la población control general

Como ya se ha mencionado, contábamos con una muestra de 367 sujetos que nunca habían sufrido un episodio de TEV. Se trataba de 156 hombres y 211 mujeres con edades comprendidas entre 18 y 65 años. La edad de esta población expresada como mediana \pm rango intercuartílico fue $27,00 \pm 15,00$ años. Las dos mutaciones objeto de este trabajo, FV Leiden y Protrombina G20210A, fueron analizadas en esta muestra. Como puede verse en la tabla II y en la figura 30, la mutación FV Leiden se encontraba presente en el 1,09% de la población de forma heterocigota con una frecuencia alélica del 0,54%. No se encontró ningún caso de homocigosis (AA). El polimorfismo de la protrombina estaba presente en el 3,54% de la población con 1,77% como frecuencia alélica. Al igual que en el caso de FV Leiden, no se encontró ningún homocigoto.

Tabla II: Análisis de las dos anomalías genéticas en la población control.

	Genotipo GG	Genotipo GA	Genotipo AA	Prevalencia	Frec. alélica
FV Leiden	363	4	0	1,09%	0,54%
Protrombina G20210A	354	13	0	3,54%	1,77%

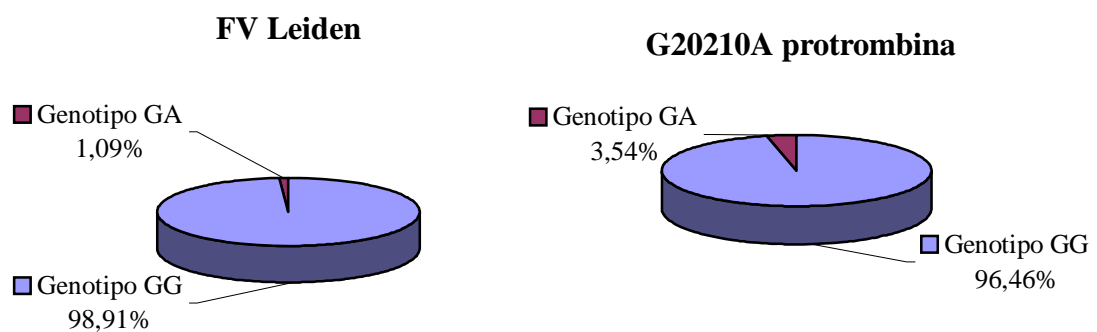


Figura 30: Prevalencia de ambas mutaciones en la población control.

Los cuatro sujetos portadores de FV Leiden, fueron 3 mujeres (75%) y un hombre (25%). En el caso de la mutación G20210A del gen de la protrombina, fueron seis mujeres (46,15%) y siete hombres (53,84%).

IV 1.2 Prevalencia en la población control navarra

De los 367 sujetos de la población control anterior, se seleccionaron los de origen navarro, siguiendo el criterio de que sus dos generaciones precedentes (sus 4 abuelos) fueran originarias de Navarra. De todos ellos, 179 sujetos cumplieron la condición propuesta. Se trataba de 68 hombres y 111 mujeres con edades comprendidas entre los 18 y 64 años. La edad de esta población expresada como mediana \pm rango intercuartílico fue $29,00 \pm 17,00$ años. Todos ellos fueron analizados genéticamente con respecto a las dos mutaciones estudiadas. Como puede observarse en la figura 31 y en la tabla III, sólo el 0,56% de los navarros analizados presentaban la mutación FV Leiden, todos de forma heterocigota. No se encontró ningún caso de homocigosis (AA). La mutación G20210A en el gen de la protrombina estaba presente en el 4,47% de los sujetos navarros. Al igual que en el caso de FV Leiden, no se encontró ningún homocigoto (AA).

Tabla III: Análisis de las dos anomalías genéticas en la población navarra.

	Genotipo GG	Genotipo GA	Genotipo AA	Prevalencia	Frec. alélica
FV Leiden	178	1	0	0,56%	0,28%
G20210A protrombina	171	8	0	4,47%	2,23%

Si excluimos de la población control los sujetos autóctonos de Navarra encontramos que el 1,59% de la población era portadora del alelo FV:Q506 (con una frecuencia alélica del 0,80%) y el 2,66% de protrombina G20210A (1,33%).

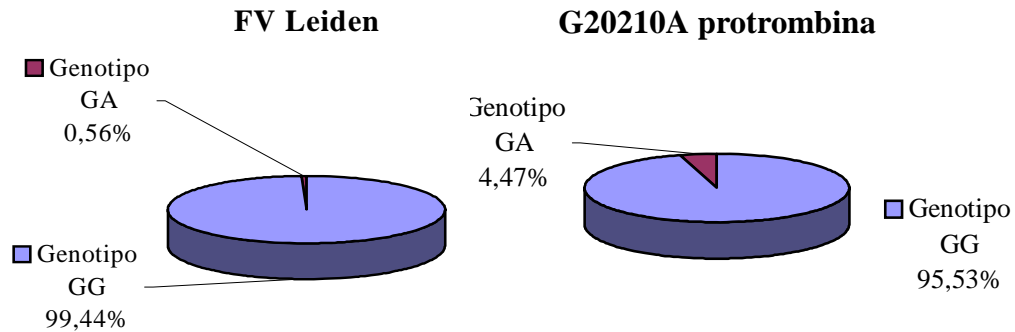


Figura 31: Frecuencias de los distintos genotipos de las dos mutaciones.

IV 2. PREVALENCIA EN UNA POBLACIÓN DE PACIENTES CON TEV

Fueron estudiados 204 pacientes. Se trataba de 109 hombres y 95 mujeres cuyas edades estaban comprendidas entre 16 y 65 años. La edad de esta población expresada como mediana \pm rango intercuartílico fue $44,00 \pm 22,50$ años. Todos los pacientes habían sufrido al menos un episodio trombotico. El 66,7% de la población (135 sujetos) presentaban un cuadro de TV, el 22,0% (45) de EP y el 11,3% (23) presentaba ambas patologías a la vez (figura 32).



Figura 32: Localización de la patología en el grupo de pacientes.

Ninguno de los casos estudiados sufría complicaciones con cuadros clínicos de carácter arterial.

De los 204 pacientes estudiados en 135 (66,2%) no existía historia previa de trombosis, mientras que los 69 restantes (33,8%) habían tenido uno o más episodios previos de TEV. En esta serie de pacientes estudiados, los distintos factores de riesgo de trombosis analizados, tanto adquiridos como congénitos, presentaban una incidencia variable que queda recogida en la tabla IV.

Tabla IV: Factores de riesgo tanto adquiridos como congénitos presentes en el grupo total de pacientes con TEV, en los pacientes portadores de FV Leiden y en los pacientes portadores del alelo 20210A en el momento de sufrir el episodio trombótico.

	Frecuencia n (%)	FV Leiden n (%)	G20210A n (%)
Cirugía	38 (18,6)	1 (4,8)	7 (29,2)
Traumatismo	25 (12,2)	4 (19,0)	5 (20,8)
Inmovilización	26 (12,7)	5 (23,8)	5 (20,8)
Neoplasia	8 (3,9)	1 (4,8)	0 (0,0)
Sobrepeso (IMC>25)	76 (37,2)	6 (28,6)	11 (45,8)
Embarazo*	14 (14,7)	1 (7,1)	1 (8,3)
Puerperio*	5 (5,3)	2 (14,3)	2 (16,6)
Anticonceptivos orales*	15 (15,8)	4 (28,6)	3 (25,0)
Déficit de PC	2 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
Déficit de PS	3 (1,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
Déficit de AT III	2 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
Hipo-Displasminogenemia	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Disfibrinogenemia	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
RPCA	27 (13,2)	21 (100)	2 (8,3)
ACA	9 (4,4)	1 (4,8)	0 (0,0)
Anticoagulante lúpico	4 (1,9)	0 (0,0)	0 (0,0)

El símbolo * hace referencia a los factores de riesgo protrombótico exclusivamente femeninos (95 mujeres estudiadas de las cuales 14 son portadoras del alelo 1691A y 12 del alelo 20210A).

La prevalencia de las dos mutaciones estudiadas, FV Leiden y mutación G20210A de la protrombina, está recogida en la tabla V y en la figura 33. Como se puede ver, las frecuencias alélicas de ambas anomalías eran muy similares en el grupo de pacientes siendo 10,29% para FV Leiden y 11,76% para el alelo 20210A. En ambos casos encontramos individuos con genotipo homocigoto (2 y 1 respectivamente).

Tabla V: Análisis de las dos anomalías genéticas en nuestro grupo de pacientes con patología de TEV.

	Genotipo GG	Genotipo GA	Genotipo AA	Prevalencia	Frec. alélica
FV Leiden	183	19	2	10,29%	5,63%
G20210A protrombina	179	23	1	11,76%	6,13%

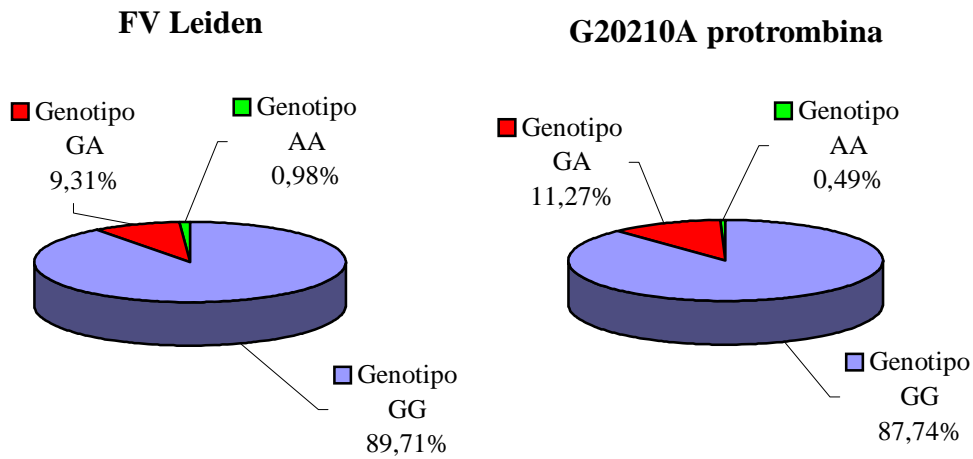


Figura 33: Frecuencias de los distintos genotipos con respecto a las dos mutaciones estudiadas en la población de pacientes con TEV.

Entre los portadores de FV Leiden (n=21), 14 (67%) fueron de sexo femenino y 7 (33%) de sexo masculino. Considerando la frecuencia de ambos

sexos en el grupo de pacientes estudiados, la prevalencia de FV Leiden en mujeres y hombres fue 14,7% (14/95) y 6,4% (7/109) respectivamente.

En el caso de Protrombina G20210A 12 de los 24 casos portadores de la mutación pertenecían al sexo femenino (50%) y otros 12 (50%) al sexo masculino. En este caso, la prevalencia en ambos sexos fue similar (12,6% en mujeres y 11% en hombres).

Los dos casos de homocigosis para FV Leiden resultaron ser mujeres con un cuadro de TVP. Una de ellas, de 17 años de edad, sufría un primer episodio trombótico al mismo tiempo que fue diagnosticada de neoplasia. La otra mujer de 33 años de edad, sufría una recaída trombótica (el primer episodio fue a los 30 años). Esta última contaba con antecedentes familiares de TEV.

El único caso de homocigosis para Protrombina G20210A también resultó heterocigoto para FV Leiden. Era una mujer de 44 años de edad diagnosticada de TVP. No era su primer episodio trombótico y esta recaída se desencadenó en un momento en el que la paciente estaba ingiriendo anticonceptivos orales.

Mutaciones y tipo de TEV

Analizamos el tipo de patología trombótica en el grupo de portadores de ambas anomalías genéticas (Figura 34).

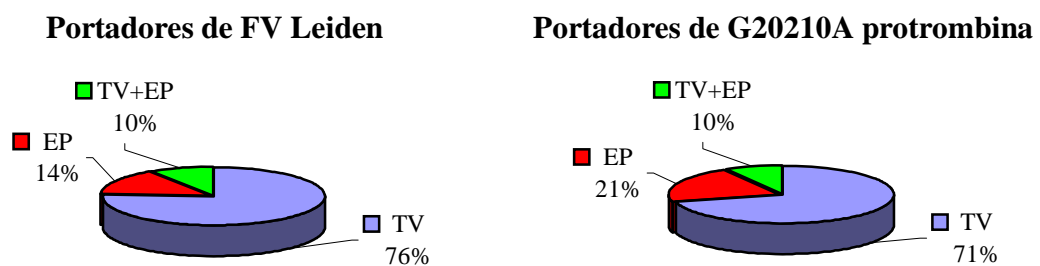


Figura 34: Localización de la patología en portadores de FV Leiden y Protrombina G20210A

Teniendo en cuenta que no pudieron ser analizados el mismo número de pacientes en todas las patologías, la frecuencia es distinta (Tabla VI).

Tabla VI: Frecuencia de portadores de los defectos FV Leiden y Protrombina G20210A en las distintas patologías de trombosis venosa

	TV	EP	TV + EP
FV Leiden	16/135=11,85%	3/45=6,66%	2/23=8,69%
Protrombina G20210A	17/135=12,59%	5/45=11,11%	2/23=8,69%

IV 3. ANÁLISIS DE FV LEIDEN Y PROTROMBINA G20210A COMO FACTORES DE RIESGO DE TEV.

IV 3.1 Cálculo de los riesgos relativos de TEV.

Para poder realizar una estimación acerca del riesgo trombotico atribuible a cada una de ambas anomalías genéticas por separado, ajustando por el resto de factores de riesgo, 162 pacientes con TEV pertenecientes al grupo que acabamos de describir, fueron pareados siguiendo el criterio de mismo sexo y misma edad con 352 controles, de forma que cada paciente estuviera emparejado al menos con un sujeto sano. No pudimos incluir los 204 pacientes en este análisis por falta de controles de esas características. Se trataba de 162 pacientes (83 hombres y 79 mujeres) con edades comprendidas entre 16 y 65 años. La edad de esta población expresada como mediana \pm rango intercuartílico fue $38,00 \pm 19,25$ años. Los controles eran 352 (152 hombres y 200 mujeres) con edades comprendidas entre 18 y 65 años ($28,00 \pm 17,00$ años). La incidencia de los diferentes factores de riesgo adquiridos está recogida en la tabla VII. Estos factores de riesgo eran evaluados en el momento de sufrir el episodio trombotico en los pacientes y cuando se realizaba el estudio biológico en los controles. Estas factores fueron contemplados como variables cualitativas salvo en el caso de la obesidad que fue representada como variable cuantitativa (IMC). El riesgo relativo se estima con la O.R. que será el término empleado en el análisis.

De los 21 sujetos portadores de FV Leiden, el 33,33% (7/21) no presentaba ninguno de los factores de riesgo contemplados en este estudio, mientras que el 71,42% (15/21) presentaba al menos factor de riesgo adquirido.

De los 24 sujetos portadores de la mutación G20210A protrombina , el 25% no presentaba ninguno de los factores de riesgo contemplados en este estudio, mientras que el 75% presentaba al menos un factor de riesgo adquirido.

Tabla VII: Factores de riesgo presentes en pacientes y controles.

Factor de riesgo	Pacientes	Controles
IMC (mediana \pm rango intercuartílico)	24,6 \pm 3,82	23,24 \pm 4,06
Inmovilización [n (%)]	14 (8,6)	2 (0,6)
Traumatismo [n (%)]	22 (13,6)	5 (1,4)
Cirugía [n (%)]	31 (19,1)	19 (5,4)
Neoplasia [n (%)]	5 (3,1)	4 (1,1)
Enfermedad arterial [n (%)]	0 (0,0)	7 (2,0)
Antecedentes familiares [n (%)]	45 (27,8)	64 (18,2)
Embarazo* [n (%)]	13 (16,4)	2 (1,0)
Puerperio* [n (%)]	5 (6,3)	0 (0,0)
Anticonceptivos orales* [n (%)]	10 (12,65)	23 (11,5)

El símbolo * hace referencia a factores de riesgo exclusivos para el sexo femenino.

IV 3.1.1 Estimación de la *O.R.* cruda

Se calculó la importancia de las diferentes variables analizadas en

cuanto al riesgo de padecer un episodio de TEV, mediante la valoración de la O.R. cruda. Los resultados obtenidos están recogidos en la tabla VIII, pudiendo observarse que tanto la presencia de FV Leiden como la de la mutación G20210A de la protrombina aumentan significativamente el riesgo de padecer TEV. Así mismo, muchas de las variables clínicas analizadas tales como obesidad, inmovilización, traumatismo, cirugía, antecedentes familiares o embarazo, se asociaban también con un aumento significativo ($p < 0,0017$) del riesgo. También se analizó como factor de riesgo el puerperio, pero el hecho de no tener datos de mujeres control con las que aparearlas nos impidió incluir este factor en el análisis estadístico.

Tabla VIII: Resultados del análisis univariante de los distintos factores de riesgo de TEV:

Factor de riesgo	O.R.	I.C. (95%)	p
FV Leiden	32,47	7,32-144,08	0,0000
Protrombina G20210A	3,37	1,58-7,18	0,0016

O.R. = *odds ratio* = parámetro estimador del riesgo relativo de TEV.

I.C. (95%) = intervalo de confianza al 95%.

p = valor de significación estadística

Los factores de riesgo cuya O.R. en este análisis univariante presentaba una p asociada inferior a 0,25 fueron utilizados para el análisis multivariante.

IV 3.1.2 Estimación de la O.R. ajustada.

Para obtener un valor más real del riesgo de TEV atribuible a FV Leiden y a Protrombina G20210A, realizamos el estudio multivariante, ajustando por el resto de factores de riesgo. Los resultados obtenidos pueden verse en la tabla IX, pudiendo comprobarse que el hecho de portar la mutación FV Leiden incrementaría el riesgo de experimentar TEV casi 50 veces. Sin embargo, en el caso de Protrombina G20210A, el riesgo se incrementaría 2,5 veces, no alcanzando éste, aun hallándose muy próximo, significación estadística tras el ajuste de los resultados con los factores de riesgo clínicos.

Tabla IX: Análisis multivariante.

Factor de riesgo	O.R.	I.C. (95%)	p
FV Leiden	48,16	6,07-381,73	0,0002
Protrombina G20210A	2,51	0,87-7,28	0,0895

IV 3.2 Asociación entre estas dos mutaciones y otros factores de riesgo

Al no haber analizado en los sujetos sanos la incidencia de alteraciones congénitas o adquiridas de la hemostasia tales como déficit de PC, PS o AT III, hipo-displasminogenemia, disfibrinogenemia, RPCA, ACA y anticoagulante lúpico, no se pudieron incluir estos en el análisis multivariante. Sin embargo, sí estudiamos su grado de asociación con el FV Leiden y con Protrombina G20210A en el grupo de pacientes con TEV (n=204). Por otra parte, los factores de riesgo adquiridos fueron estudiados en el grupo de pacientes que solamente habían sufrido un episodio de trombosis (n=135), ya que los factores presentes en el resto en el momento de la recurrencia no tendrían por qué coincidir necesariamente con los del primer evento. Como se describe a continuación, no se detectaron asociaciones entre los factores de riesgo analizados. Probablemente esto pueda deberse tamaño de la muestra analizada.

Asociación con FV Leiden

No se encontró ninguna asociación significativa entre FV Leiden y los factores de riesgo analizados, salvo en el caso de la RPCA (Tabla X). La altísima asociación entre FV Leiden y RPCA se explica porque todos los individuos que presentan la mutación presentan también resistencia a la PCA. Tampoco se encontró asociación significativa entre FV Leiden y Protrombina G20210A.

Tabla X: Asociación entre FV Leiden y otros factores de riesgo (ajuste por edad). El valor O.R.=1 se consideraría falta de asociación entre los factores.

Presencia de factor de riesgo	O.R.	I.C. (95%)
RPCA	43,49	12,27-154,12

Protrombina G20210A	0,73	0,15-3,46
---------------------	------	-----------

En nuestro estudio, el 77,77% (21/27) de los sujetos con fenotipo resistente a la PCA presentaba el alelo FV:Q506.

Asociación con G20210A de la protrombina

No se detectó ninguna asociación entre Protrombina G20210A y el resto de los factores estudiados, ya que a pesar de que se encontró un valor de O.R. elevado para el puerperio, éste no alcanzó la significación estadística (Tabla XI).

Tabla XI: Asociación entre protrombina G20210A y otros factores de riesgo (ajuste por edad). El valor O.R.=1 se consideraría falta de asociación entre los factores.

Presencia de factor de riesgo	O.R.	I.C. (95%)
Puerperio	4,09	0,33-51,32

IV 3.3 Análisis de la influencia de FV Leiden y Protrombina G20210A en la patología trombótica venosa.

Se estudió la influencia de las dos mutaciones en la edad de la primera trombosis y en la recurrencia.

IV 3.3.1 Influencia de FV Leiden y Protrombina G20210A en la edad del primer episodio trombótico

Para este estudio se analizaron aquellos pacientes que estudiamos en el momento de su primer episodio trombótico.

Contrastamos la edad en la que los pacientes sufrían su primer episodio trombótico entre portadores de FV Leiden, de protrombina G20210A, de ambas a la vez y de otras anomalías congénitas (déficit de PC, PS y ATIII) con un grupo de pacientes que no presentaba ninguna anomalía genética de las analizadas (Tabla XII). El test realizado fue el de comparación de medias U de Mann-Whitney. La edad se expresa como mediana \pm rango intercuartílico. Se

encontraron diferencias significativas entre la edad de primer episodio trombótico de portadores del alelo FV:Q506 y aquellos sujetos no portadores de ningún defecto congénito. No se encontraron diferencias significativas en el caso de Protrombina G20210A.

Tabla XII: Edad del primer episodio de TEV en los distintos genotipos.

Portadores de:	Edad del primer episodio
FV Leiden (n=19)	30,0 ± 23,5 *
Protrombina G20210A (n=22)	37,0 ± 22,0
FV Leiden y protrombina G20210A (n=2)	32,0 ± 12,0
Otras anomalías congénitas (n=7)	47,0 ± 24,0
Ninguna anomalía congénita (n=154)	43,0 ± 23,0

* p=0,003 respecto al grupo sin ninguna anomalía congénita.

La distribución de las mutaciones según la edad del primer episodio de TEV puede observarse en la tabla XIII. Para ello agrupamos todos los pacientes según la edad a la que hubían sufrido el primer evento trombótico. Calculamos la frecuencia de portadores de ambas mutaciones en los distintos rangos de edad.

Tabla XIII: Distribución de ambas anomalía genéticas en distintos rangos de edad establecidos en la población de pacientes.

Rango de edad	FV Leiden	Protrombina G20210A
<30 años (n=47)	10 (21,27%)	6 (12,76%)
30-39 (n=52)	6 (11,54%)	8 (15,38%)
40-49 (n=39)	2 (5,12%)	3 (7,69%)
50-65 (n=66)	3 (4,54%)	7 (10,60%)

Como una primera y necesaria aproximación a qué variables pueden influir en este parámetro, se realizó una regresión lineal. En nuestro modelo de trombosis en este análisis univariante, tanto sufrir traumatismo como presentar un fenotipo resistente a la PCA parece adelantar un episodio trombotico de forma significativa. La presencia de FV Leiden adelantaría un episodio 10 años. El resto de los factores, incluido el polimorfismo en el gen de la protrombina, no presentaron significación estadística (Tabla XIV).

Para obtener unos resultados más fieles a la realidad realizamos un estudio multivariante en el que incluimos aquellos factores congénitos cuya p fue inferior a 0,25 en el análisis univariante. Por este motivo, G20210A no pudo ser incluido (Tabla XV). Los datos de la tabla XV reflejan que la presencia de FV Leiden adelantaría el primer episodio de TEV unos 8 años. Protrombina G20210A no precipitaría la aparición de la patología a una edad más temprana.

Tabla XIV: Factores de riesgo en población de pacientes que se asocian significativamente a la edad del primer episodio trombotico.

Variable	β	r^2	p
FV Leiden	-10,212	0,046	0,009
Protrombina G20210A	-3,701	0,007	0,322
Sexo	2,022	0,005	0,387
Cirugía	2,319	-0,003	0,434
Traumatismo	-6,960	0,03	0,029
Inmovilización	4,652	0,015	0,145
Obesidad	0,917	0,046	0,014
Neoplasia	5,661	0,005	0,378
Antecedentes familiares	-3,472	0,010	0,228
Déficit de PC	-7,875	0,002	0,578
Déficit de PS	-6,650	0,005	0,419
Déficit de AT III	-3,367	0,001	0,738
RPCA	-6,660	0,023	0,066
ACA	-2,247	0,001	0,703
Anticoagulante lúpico	9,349	0,007	0,341

Tabla XV: Resultado tras el análisis multivariante de los factores de riesgo en el grupo de pacientes.

Variable	β	I.C. (95%)	p
FV Leiden	-8,406	(-16,065)-(-0,748)	0,032

IV 3.3.2 Influencia de FV Leiden y Protrombina G20210A en la recurrencia

Estudiamos la frecuencia de recurrencia trombotica entre los portadores de las dos anomalías genéticas que resultó ser del 33% en ambos casos (Tabla XVI).

Tabla XVI: Frecuencia de recurrencia trombotica en pacientes portadores de FV Leiden y Protrombina G20210A.

	Recurrencia	Primer episodio
FV Leiden (n=21)	7/21 (33%)	14/21 (67%)
Protrombina G20210A (n=24)	8/24 (33%)	16/24 (67%)

Las variables candidatas al análisis multivariante fueron previamente estudiadas mediante regresión logística.

En los resultados recogidos en la tabla XVII se observa que únicamente la edad del primer episodio trombotico y la presencia de antecedentes familiares de trombosis parecen facilitar una recaída trombotica.

Se repitió este análisis univariante para FV Leiden y Protrombina G20210A, pero esta vez ajustando por edad ya que aquellos casos en los que el primer episodio trombotico se desarrolló a una edad joven tienen más oportunidades a lo largo de la vida de sufrir una recaída trombotica (Tabla XVIII).

Tabla XVII: Análisis univariante para determinar las variables que puedan influir en la recurrencia de TEV.

Variable	O.R.	I.C.	p
FV Leiden	1,4149	0,54-3,72	0,4815
Protrombina G20210A	1,4556	0,58-3,63	0,4207
Sexo	1,0262	0,55-1,92	0,9355
Edad del primer episodio	0,9694	0,94-0,99	0,0163
Antecedentes familiares	3,1505	1,58-6,29	0,0011
Déficit de PC	0,5424	0,06-4,75	0,5806
Déficit de PS	1,0019	0,30-3,29	0,9976
RPCA	1,5521	0,64-3,73	0,3261
ACA	1,4286	0,34-5,93	0,6234
Anticoagulante lúpico	2,9302	0,40-21,44	0,2897

Tabla XVIII: Análisis univariante ajustado por edad.

Variable	O.R.	I.C.	p
FV Leiden	1,5110	0,56-4,09	0,4165
Protrombina G20210A	1,4949	0,60-3,74	0,3901

El hecho de que las “p” asociadas a FV Leiden y Protrombina G20210A no fueran inferiores a 0,25 impide que ambas variables puedan ser ajustadas por otras variables en un estudio multivariante. Sin embargo, el hecho de no obtener, a la vista de los resultados expuestos en la tabla 27, O.R. que demuestren que FV Leiden o Protrombina G20210A incrementan el riesgo de recurrencia, no nos va a permitir afirmar que estas mutaciones no influyen en este aspecto de la patología, ya que nuestro estudio no es prospectivo. Insistiendo en esta idea, realizamos una tabla de contingencia en la que observamos que el 12,96% de los casos recurrentes y el 9,52% de los casos no recurrentes analizados en este estudio eran portadores del alelo FV:Q506 (el 87,03% y 90,48% respectivamente era no era portador). Estos datos nos confirman que el resultado obtenido en la tabla XVIII debe interpretarse con mucha precaución. El hecho de que el porcentaje de FV Leiden (+) en el grupo de recurrentes sea más elevado que en el grupo de no recurrentes nos impide

descartar que FV Leiden facilite una recaída trombótica, a pesar del resultado descrito en la tabla XVIII.

La misma aproximación al problema se utilizó para la mutación Protrombina G20210A y observamos que el 15,09% de los casos recurrentes y el 10,88% de los casos no recurrentes analizados en este estudio eran portadores del alelo 20210A (el 84,90% y 89,12% respectivamente era no era portador). Dado que en este caso también es superior la frecuencia de Protrombina G20210A (+) en el grupo de pacientes recurrentes, también sería necesario realizar un estudio prospectivo para confirmar estas sospechas.

Queremos reseñar, aunque no se trate de un dato concreto relacionado directamente con FV Leiden o Protrombina G20210A, que en el análisis multivariante para ver si alguna de las variables estudiadas podría influir en la recaída trombótica, encontramos la presencia de historia familiar de trombosis como un factor de riesgo muy significativo para recurrencia trombótica (Tabla XIX). Por lo tanto, parece que la carga genética jugaría un papel importante en la recurrencia trombótica.

Tabla XIX: Análisis multivariante de las variables en estudio frente al hecho de sufrir una recaída trombótica. Este análisis se realizó ajustando por edad.

Variable	O.R.	I.C.	p
Antecedentes familiares	3,1471	1,50-6,61	0,0025

En nuestro estudio, solamente uno de los dos homocigotos para FV Leiden sufría una recaída trombótica. También presentó recurrencia el caso portador de las dos anomalías genéticas (AA para Protrombina G20210A y GA para FV Leiden).

IV 4. ANÁLISIS DE POSIBLES MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE HIPERCOAGULABILIDAD EN LA MUTACIÓN G20210A DE LA PROTROMBINA

IV 4.1 Protrombina G20210A y factor II coagulante (FII:C)

Se determinaron los niveles de FII en 12 sujetos sanos portadores del polimorfismo de forma heterocigota y en 12 sujetos también sanos no portadores, pareados por edad y sexo, así como en 15 pacientes con TEV portadores y en 15 no portadores pareados con los anteriores por el mismo criterio. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla XX como media \pm DE. No existieron diferencias entre las concentraciones plasmáticas de FII:C de pacientes con genotipo GG y controles con ambos genotipos. No obstante, es destacable el aumento del nivel de protrombina hallado en los pacientes portadores del polimorfismo con respecto a los controles portadores. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa ($p=0,004$).

Tabla XX: Niveles de Factor II:C (%) en sujetos sanos portadores y no portadores de la mutación Protrombina G20210A y en un grupo de pacientes portadores y no portadores de la mutación Protrombina G20210A.

		FII:C
Pacientes	GA (n=12)	112,67 \pm 8,20
	GG (n=12)	86,33 \pm 20,93
Controles	GA (n=15)	87,50 \pm 24,59
	GG (n=15)	86,36 \pm 17,10

El rango de normalidad se considera del 70 al 120%.

Los niveles de FII:C estaban significativamente más elevados en los pacientes que en los controles (99,50% vs 86,93%; $p=0,039$). Así mismo, aparecían más altos en los portadores de la mutación Protrombina G20210A respecto a los no portadores, al borde de la significación estadística (97,35%

vs 86,35%; $p=0,066$). El hecho de que la interacción sea significativa ($p=0,038$) sugiere que los niveles plasmáticos de protrombina están condicionados por la mutación de forma diferente según el sujeto sea paciente o control, destacando así el aumento de los niveles de protrombina en los pacientes portadores de la mutación, no así en el grupo de controles portadores ($p=0,004$), como se aprecia en la figura 35. En cualquier caso no hay que olvidar que en ningún caso se sobrepasa el límite de normalidad de la prueba.

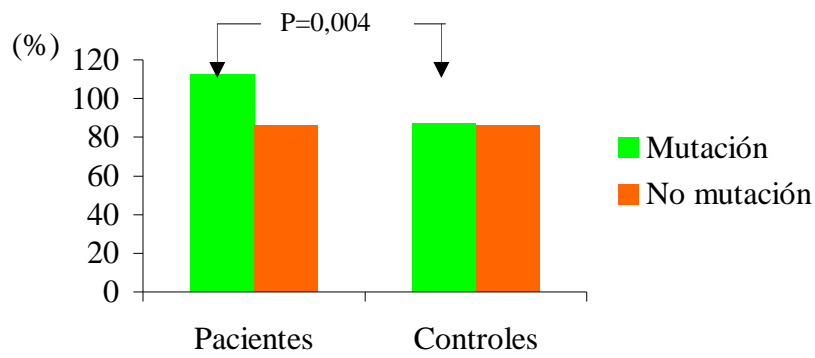


Figura 35: Niveles de FII:C (%) en los grupos de pacientes y controles, desglosados ambos en portadores de Protrombina G20210A y no portadores.

IV 4.2 G20210A y marcadores de hipercoagulabilidad

IV 4.2.1 F1+2.

Se determinaron los niveles de F1+2 en los mismos grupos de portadores y no portadores de G20210A descritos en el apartado anterior. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla XXI como media \pm DE. Aunque los pacientes portadores del polimorfismo presentan concentraciones más elevadas de F1+2, no se encontraron diferencias significativas.

La diferencia encontrada entre pacientes y controles, resultó significativa (0,80 vs 0,61 nmol/mL; $p=0,029$), no así entre portadores y no portadores del polimorfismo (0,71 vs 0,67 nmol/mL; $p=0,676$), ni la interacción ($p=0,745$). Por lo tanto, parece que los niveles plasmáticos de

F1+2 no estarían condicionados por el polimorfismo, como se aprecia en la figura 36.

Tabla XXI: Niveles plasmáticos de F1+2 (nmol/mL).

		F1+2
Pacientes	GA (n=12)	0,83 ± 0,36
	GG (n=12)	0,76 ± 0,42
Controles	GA (n=15)	0,61 ± 0,13
	GG (n=15)	0,60 ± 0,27

El rango de normalidad se considera de 0,4 a 1,1 nmol/mL.

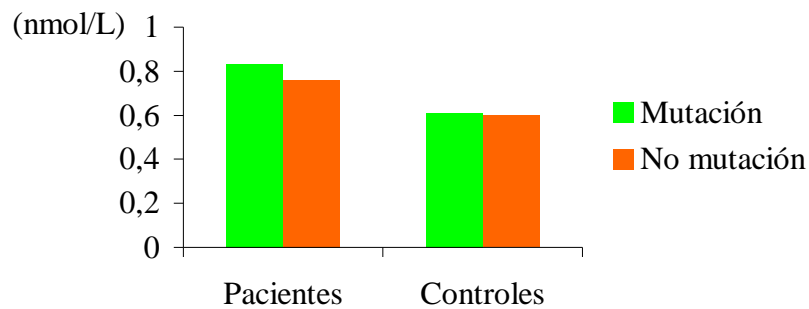


Figura 36: Niveles de F1+2 (nmol/mL) en los grupos de pacientes y controles, desglosados ambos en portadores de Protrombina G20210A y no portadores.

IV 4.2.2 TAT

Se determinaron los niveles de TAT en los mismos grupos descritos en los apartados anteriores. Los resultados se expresan en la tabla 35 como media \pm DE. A pesar de encontrar más elevado el nivel de TAT en pacientes portadores del polimorfismo, esta elevación no resultó significativa respecto a ninguno de los otros tres grupos analizados. No se encontraron diferencias significativas comparando el genotipo GA frente a GG ni en pacientes ni en controles (Tabla XXII y figura 37).

Tabla XXII: Niveles plasmáticos de complejos TAT ($\mu\text{g/L}$).

		TAT ($\mu\text{g/L}$)
Pacientes	GA (n=12)	$2,91 \pm 2,77$
	GG (n=12)	$2,07 \pm 2,28$
Controles	GA (n=15)	$0,62 \pm 0,50$
	GG (n=15)	$0,84 \pm 0,83$

El rango de normalidad se considera de 1 a 4,1 $\mu\text{g/L}$.

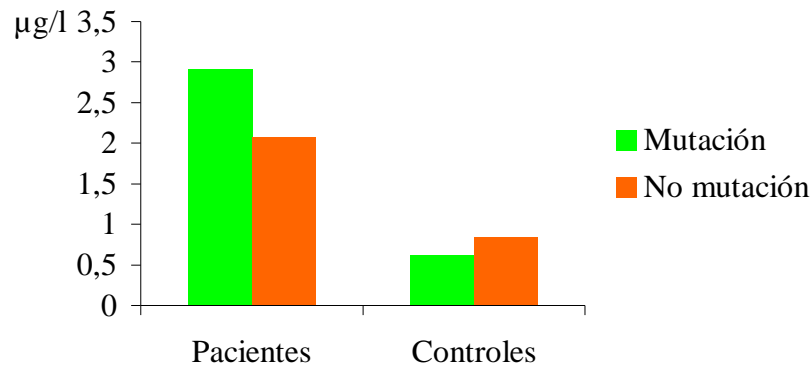


Figura 37: Niveles de TAT ($\mu\text{g/L}$) en los grupos de pacientes y controles, desglosados ambos en portadores de Protrombina G20210A y no portadores.

Los niveles de complejos TAT estaban significativamente más elevados en los pacientes que en los controles ($2,49$ vs $0,73$ $\mu\text{g/L}$; $p=0,001$), pero no se vieron diferencias significativas entre portadores y no portadores ($1,64$ vs $1,39$ $\mu\text{g/L}$; $p=0,598$) ni en la interacción ($p=0,283$), lo que sugiere que la concentración de los complejos TAT no estaría condicionada por el polimorfismo, aunque un ligero incremento puede apreciarse en los pacientes portadores respecto a los no portadores.

IV 4.2.3 Dímero D

Se determinaron los niveles plasmáticos de Dímero D en los mismos grupos de portadores y no portadores de Protrombina G20210A descritos en

los apartados anteriores. No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos analizados (Tabla XXIII).

Tabla XXIII: Niveles plasmáticos de DD (ng/mL).

		DD (ng/mL)
Pacientes	GA (n=12)	224 ± 48,82
	GG (n=12)	209,83 ± 46,45
Controles	GA (n=15)	177,71 ± 31,01
	GG (n=15)	204,85 ± 89,02

El rango de normalidad se considera por debajo de 500 ng/mL.

No se encontraron diferencias significativas ni entre pacientes y controles (216,92 vs 191,28 ng/mL; p=0,123) ni entre portadores y no portadores del polimorfismo (199,08 vs 207,15 ng/mL; p=0,622), por lo que no parece que la mutación Protrombina G20210A pueda condicionar los niveles de DD. Estos resultados se expresan gráficamente en la figura 38.

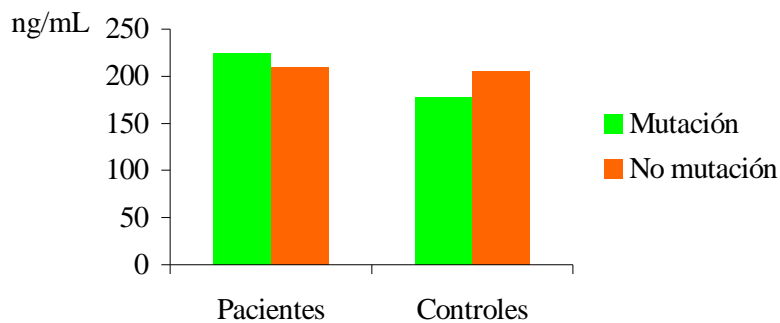


Figura 38: Niveles de DD (ng/mL) en los grupos de pacientes y controles, desglosados ambos en portadores de Protrombina G20210A y no portadores.

V. Discusión

V 1. FV LEIDEN

V 1.1 Prevalencia en la población control

Al estimar la prevalencia de FV Leiden en la población control observamos que ésta era llamativamente baja, tanto en la población control total como en los sujetos que cumplían los requisitos propuestos para ser considerados de origen navarro (frecuencia alélica 0,54 y 0,28%, respectivamente).

Desde su descripción en 1994 se han publicado numerosos trabajos donde la prevalencia de esta anomalía en la población control varía en función del área geográfica y grupo étnico considerado. Los resultados obtenidos en los distintos trabajos para definir la distribución geográfica de FV Leiden se presentan en la tabla XXIV. La distribución de FV Leiden parece estar centrada en Europa extendiéndose por el norte de la India y el este de Arabia Saudí. La emigración de europeos en los últimos 500 años ha introducido la mutación en América y Australia. En Asia, la ausencia de FV Leiden probablemente explique en parte la baja incidencia de trombosis venosa [168]. La afinidad existente entre los esquimales y la población asiática podría ser la causa de que tampoco se encuentre en Groenlandia [101].

La explicación de por qué el FV Leiden está centrado en Europa se encuentra en la teoría más aceptada sobre el origen del ser humano actual (basada en análisis arqueológicos, lingüísticos y de ADN). Esta teoría apoya la idea de que fue el *Homo sapiens* africano el que hace 100.000 años pobló el resto del mundo [169,170]. Los primeros hombres semejantes al actual aparecen en Europa hace 40-50.000 años. Durante el período del Neolítico (hace 10.000 años), movimientos migratorios de Oriente Medio se extendieron hacia el noroeste de Europa [171]. No se sabe si reemplazaron a la población original o si se establecieron entre los indígenas europeos. Recientes análisis de ADN mitocondrial sugieren esta última opción [172].

Tabla XXIV: Distribución geográfica de FV Leiden

Europa		
País	Nº sujetos en estudio	Frec alélica (%)
Grecia [102]	187	7,0
Chipre [106]	99	7,0
Turquía [106,173]	405	4,8
Suecia [174]	101	5,9
Hungría [175]	132	5,7
Alemania [102,104,176]	1043	3,6
Dinamarca [177]	4.188	3,4
Gran Bretaña [102,178]	381	3,4
Islandia [102,138]	255	2,9
Austria [179]	104	2,4
Italia [102,180-182]	1.207	1,4
Holanda [120]	474	1,5
Finlandia [183]	137	1,5
Groenlandia [182]	133	0
Francia [184]		
París	597	2,59
Sur de Francia	492	1,72
Región vasco-francesa	198	0,5
España [101,108]	200	1,75
País vasco [101]	28	0
Navarra [185]	304	0,33
Asia		
Rusia (Dagestán) [101]	156	4,5
India [102]	203	1,2
Arabia Saudí [102,105]	255	0,98
Polinesia [186]	174	0,2
China [102,187,188]	254	0
Indonesia [102]	105	0
Japón [187,189]	462	0
Tailandia [190]	114	0
Korea [187]	93	0
Mongolia [102]	36	0
Sri Lanka [102]	47	0
Taiwan [102]	83	0
Africa		
Senegal [102]	96	0
Zambia [102]	95	0
Kenia [102]	60	0
Sur del Sáhara [191]	308	0
América		
País	Nº sujetos en estudio	Frec alélica (%)

América del Norte		
Raza blanca [192]	704	3
Raza negra [102,193,194]	307	0,65
Hispanoamericanos [195]	179	1,65
Afroamericanos [195]	178	0,87
Asiaticoamericanos [195]	191	0
Americanos nativos [195]	54	0
Judíos asquenacís [101]	91	1,1
Indios de la Isla Vancouver [102]	36	0
Indios Pima de Arizona [196]	302	0,17
América del Sur		
Colombia [197]	150	0
Indios de Perú [102]	19	0
Indios del Amazonas [198]	83	0
Raza negra brasileña [198]	137	0,4
Australia		
Australia		
Población indígena [102]	73	0
Australiano-caucásicos [199]	126	2
Nueva Guinea (Papúa) [102]	95	0

La limitada distribución racial y geográfica del FV Leiden sugiere un único origen de la mutación precisamente en la citada población. La alta prevalencia de la mutación entre la población griega y turco-chipriota sugiere que fue éste el lugar de origen de la mutación. Se piensa que quizá el ejército de Alejandro Magno extendió la mutación en sus invasiones por Europa y norte de la India. Este único origen del FV Leiden ha sido confirmado mediante análisis de haplotipos. Se han estudiado polimorfismos aparentemente neutrales (del exón 13 del gen del FV) que están ligados a la mutación FV Leiden en la segregación genética [200]. Todos los estudios confirman la evidencia de un único origen [200-202]. Incluso se han analizado dos homocigotos de origen asiático concluyéndose que el FV Leiden en la población asiática tiene el mismo origen que el FV Leiden encontrado en Europa [203].

La prevalencia encontrada en la población navarra difiere bastante de la encontrada en la mayoría de las poblaciones europeas. Sin embargo, es similar en la población vasca (0% en una muestra pequeña de 28 sujetos) [101] y vasco francesa (0,5%) [184]. La población vasca es representativa de una

población que ocupó el oeste de Europa en un período anterior al Neolítico (teoría basada en datos lingüísticos, históricos y arqueológicos) y que hoy en día se encuentra en los Pirineos Occidentales (sur de Aquitania en Francia y Navarra y País Vasco en España) [204]. En este contexto, la casi ausencia de FV Leiden en la población navarra apoya la teoría propuesta por Rees [101] para explicar la propagación del FV Leiden por Europa. Como la población vasca se estableció en el Pirineo Occidental antes de la propagación de la mutación, la migración desde Oriente Medio en el periodo del Neolítico no afectó a esta población, probablemente algo aislada y preestablecida en el Pirineo Occidental [185].

V 1.2 Prevalencia en la población con TEV

El 10,29% de los 204 pacientes analizados presentaban la mutación FV Leiden (19 heterocigotos y 2 homocigotos). La frecuencia alélica estimada fue 5,63%. La frecuencia del genotipo homocigoto fue 0,98% (2/204).

La variación de la prevalencia de esta mutación en los distintos estudios depende, en gran parte, de la selección realizada en el grupo de pacientes analizados. La mayoría de los grupos de investigación han analizado pacientes consecutivos con cuadro de TEV no seleccionados por ningún otro criterio. Rosendaal y cols. [120] analizaron 471 pacientes consecutivos con un primer episodio trombótico. La frecuencia alélica estimada fue 10,5%. Ehrenforth y cols. [205] analizaron 731 sujetos con historia personal de TEV. La frecuencia alélica en este caso fue 15,8%. Esta última cifra es muy elevada, pero hay que tener en cuenta que este estudio se realizó en Alemania, donde la prevalencia en la población control es también muy alta.

Nuestra frecuencia es menor que la mayoría de las descritas en la población con TEV, pero muy alta en comparación con la estimada en la población control de nuestra área. La proporción de homocigotos en nuestra serie fue 0,98% comparable con la descrita por Rosendaal y cols. [120] (1,48%). Ehrenforth y cols [205] contaron 33 homocigotos entre 731 pacientes (4,5%). Como hemos comentado anteriormente, este trabajo es llamativo por

la alta prevalencia de FV Leiden tanto en la población con TEV como en la población control. Nuestros resultados nos permiten compartir la idea sugerida en estos trabajos respecto a la fuerte asociación encontrada entre FV Leiden y el desarrollo de TEV.

No hay muchos estudios que asocien la prevalencia de FV Leiden con el sexo de los portadores. En nuestro trabajo el defecto es más prevalente en el sexo femenino (14,7%) que en el masculino (6,4%). En el estudio de Ehrenforth y cols. observaron que un 62% de los portadores eran mujeres, pero esto no les permitía concluir nada por la elevada frecuencia de mujeres en el grupo de pacientes analizados [205]. Svensson y cols. [206] también encontraron FV Leiden más común en mujeres (19/109) que en hombres (3/89). Sin embargo, en un estudio realizado en España [108] con 51 pacientes por García-Gala y cols. se afirma no haber encontrado ninguna diferencia de sexo entre portadores y no portadores de la mutación, aunque en este caso el tamaño muestral era sensiblemente inferior.

Estudiamos la localización de la patología entre los portadores de FV Leiden y encontramos que un 76% sufría TV, 14% EP y 10% ambas (TV+EP). De todos modos, teniendo en cuenta que la TV fue la patología más común en el grupo de pacientes, calculamos que el 11,85% de los pacientes con TV, el 6,66% de los pacientes con EP y el 8,69% de los que sufrían ambas patologías eran portadores de FV Leiden. Hay investigaciones previas que también sugieren que FV Leiden es menos frecuente en los pacientes con EP que en pacientes con TV (Tabla XXV).

En nuestros resultados, al igual que en los trabajos de Manten y cols., Martinelli y cols. y Turkstra y cols. observamos que la prevalencia en el grupo de TV es el doble que en EP, y que en los pacientes que sufren ambas patologías trombóticas es entre 1,5 y 3 veces mayor que en el caso de EP. Estos resultados avalan la idea de que la presencia de FV Leiden, cuando menos, permite el desarrollo de TV con un riesgo relativamente limitado de sufrir embolismo [207]. Aunque no está claro todavía, es posible que el desarrollo de TV en pacientes heterocigotos para FV Leiden conlleve un

proceso de inflamación local mayor debido a una elevada generación de trombina, lo cual dificultaría el desplazamiento del trombo [208]. También se ha sugerido que la estructura del trombo formado en un sujeto portador de FV Leiden puede ser más estable [209-211]. Además, también podría contribuir una menor actividad fibrinolítica debido a un aumento en la activación del TAFI en pacientes con RPCA [212].

Tabla XXV: Frecuencia de portadores del defecto FV Leiden según la localización de la patología trombótica.

	n	TV	n	EP	n	TV + EP
Manten y cols. [209]	211	17,5%	45	8,9%	23	13%
Martinelli y cols. [213]	106	22,6%	41	4,9%	65	16,9%
Baglin y cols. [211]	471	19,5%	207	12,1%		
Turkstra y cols. [207]			67	7,4%	25	24%
Nuestros datos	135	11,8%	45	6,6%	23	8,7%

V 1.3 FV Leiden como factor de riesgo de TEV

Nuestros resultados reflejan que la presencia de FV Leiden incrementaría el riesgo de experimentar TEV casi 50 veces. La asociación entre la mutación y el riesgo de sufrir TEV ha sido claramente establecida [214], aunque haya algunos autores que lo hayan puesto en duda [215,216]. La cosegregación de TEV con esta mutación ha sido demostrada en numerosos estudios familiares en los que los heterocigotos y homocigotos para FV Leiden presentan un riesgo 5-10 y 50-80 veces respectivamente, más elevado que los no portadores de esta mutación. El riesgo relativo calculado en nuestro estudio resulta elevado, probablemente debido al escaso número de portadores en la población control.

El mecanismo fisiopatológico por el cual FV Leiden supone un factor de riesgo trombótico ha sido ampliamente descrito en la literatura. El alelo FV:Q506 provoca un fenotipo resistente a la PCA dificultando, así, la

actividad anticoagulante de ésta [4]. No obstante, también se ha observado en los portadores de FV Leiden un mecanismo trombótico adicional mediado por la inhibición de la fibrinólisis, ya que Bajzar y cols. [212] comprobaron una mayor activación de TAFI como respuesta a una elevada generación de trombina. La inhibición de la capacidad fibrinolítica añadida a un estado de hipercoagulabilidad supondría un componente protrombótico adicional.

Entre nuestro grupo de pacientes, FV Leiden fue cada vez menos prevalente en el grupo de pacientes conforme avanzaba la edad del primer episodio de trombosis (21,27% en pacientes menores de 30 años y 4,54% en mayores de 50). Esto no significa que la población portadora de edad avanzada presente una menor probabilidad de sufrir trombosis, sino que la agresividad trombótica por parte de FV Leiden es tal que provocaría el desarrollo de episodios a una edad generalmente temprana. El hecho de ser tan poco frecuente en el grupo de pacientes de mayor edad con un primer episodio de TEV, nos indica que probablemente suponga un factor de selección natural.

Entre el grupo de pacientes encontramos dos mujeres con el genotipo homocigoto para FV Leiden, mientras que no encontramos ningún varón homocigoto en nuestra serie. Este dato coincide con la observación de Rosendaal y cols. [120] de que la mayoría de los homocigotos eran del sexo femenino. El primer caso se trataba de una mujer de 17 años recién diagnosticada de neoplasia. Éste era su primer episodio trombótico. El segundo caso se trataba de una mujer de 33 años con antecedentes familiares de TEV. Sufría una recaída trombótica. Su primer episodio se desencadenó a los 30 años. Rosendaal y cols. [120] consideran que la mayoría de los individuos homocigotos para esta anomalía experimentarán al menos un episodio trombótico a lo largo de su vida. No obstante, la homocigosis para FV Leiden es menos severa que la homocigosis para deficiencia de PC o PS [217]. Esto puede deberse a que la mutación impide la acción inactivadora de la PCA en uno de los tres puntos de rotura (Arg506), pero sigue permitiendo la escisión en Arg306 y 679. Así, la inactivación del FVa por la PCA, aunque de un modo deficiente por ser 10 veces más lenta, aún puede llevarse a cabo [91,92].

Hay estudios que consideran que si el FV Leiden es el único factor de riesgo presente, la probabilidad de sufrir un episodio trombótico es muy pequeña. Samama y cols. [218] estudiaron 18 pacientes homocigotos y observaron que solamente dos de ellos (13%) habían presentado un episodio trombótico de manera espontánea. Esto sugiere que la presencia de otros factores de riesgo se haría necesaria para la aparición de la patología trombótica, apoyando la teoría cada vez más aceptada, de que la trombosis sería una enfermedad de origen multigénico. Es decir, se requeriría más de una anomalía genética y el factor desencadenante final sería un factor de riesgo adquirido que precipitaría el episodio [99]. En nuestro modelo de trombosis encontramos que un 33,33% de los pacientes portadores (7/21) no presenta, aparentemente, ningún factor de riesgo adicional a FV Leiden. Esto probablemente podría deberse a la presencia de factores genéticos aún sin descubrir.

A pesar de que el FV Leiden predispone a sufrir una patología trombótica, no es considerada una mutación asociada a mortalidad. El EP puede llegar a ser fatal, sin embargo, la prevalencia de FV Leiden en este tipo de pacientes es baja [219,220]. Son varios los estudios que se han realizado en poblaciones de tercera edad [221-223] encontrándose una frecuencia alélica que varía entre 1,9 y 3,5%. Incluso ha sido descrito un caso de homocigosis en una mujer centenaria [224]. Estos hallazgos indican que el FV Leiden es compatible con la edad avanzada y no es causa de mortalidad [223]. Incluso Mannucci y cols. [221] ponen en duda el hecho de que el FV Leiden suponga un factor de riesgo de TEV ya que son varios los ancianos portadores que han sido expuestos a situaciones de riesgo trombótico (traumatismo, embarazo y cirugía) a lo largo de su vida, sin haberse desencadenado un episodio de trombosis. Esta teoría choca con la mayoría de trabajos, entre ellos el nuestro, expuestos hasta hoy. Es posible que estos ancianos posean una carga genética que los proteja contra la tendencia protrombótica. También es posible que el FV Leiden sea un polimorfismo equilibrado. Es decir, así como es una mutación que supone un riesgo trombótico, quizá también ofrezca alguna ventaja [107]. Por ejemplo, aunque no sea el caso de los ancianos, podría

disminuir el riesgo de mortalidad por hemorragia post-parto o la pérdida de hierro especialmente durante el período femenino. De acuerdo con esta hipótesis, Lindqvist y cols. [225] demostraron que las portadoras del alelo FV Leiden presentaban un riesgo significativamente menor de sufrir complicaciones hemorrágicas en el parto. A pesar de que parece evidente sugerir que el estado protrombótico conlleve una reducida pérdida de sangre, no se han realizado estudios que prueben este efecto.

V 1.4 Asociación con otros factores de riesgo trombótico

El TEV es una enfermedad común con una incidencia anual en uno de cada mil individuos. La naturaleza multifactorial de esta enfermedad a la que ya hemos aludido, es confirmada por la frecuente presencia de varios factores de riesgo genéticos o ambientales en los pacientes con trombosis. En esta línea, FV Leiden parece suponer un importante factor de riesgo para TEV, aunque hay estudios que consideran que en ausencia de otro factor protrombótico, la probabilidad de sufrir un episodio de trombosis es muy pequeña [218]. En este estudio contemplamos con especial atención la posible exposición de los pacientes a otros factores de riesgo adicionales.

Factores de riesgo adquiridos

Estudios previos han revelado que ciertas condiciones adquiridas como traumatismo, cirugía, inmovilización, embarazo, puerperio y uso de anticonceptivos orales son importantes factores de riesgo para TEV.

Cirugía

Nuestros resultados confirman que la cirugía supone un factor de riesgo importante para TEV. No hemos encontrado asociación entre este factor y la presencia del alelo FV:Q506 aunque consideramos que la exposición a ambos riesgos predispone de un modo especial a desencadenar un episodio de TEV. Entre nuestra serie de pacientes, encontramos un caso portador de un alelo FV:Q506 que tras cirugía sufrió un episodio de TVP a una edad joven (30 años).

Middeldorp y cols. [215] describieron que el 20% de los procesos trombóticos sufridos en un grupo de portadores de FV Leiden se encontraba asociado a una operación quirúrgica. Lindahl y cols. [226] confirmaron que la RPCA es un frecuente factor de riesgo para TVP (O.R.=5,0) tras implante de prótesis de cadera o rodilla. Sin embargo, un estudio similar realizado por Ryan y cols. [227] no corrobora estos resultados. Emmerich y cols. [217] estudiaron un grupo de 36 pacientes con TEV homocigotos para FV Leiden y observaron que la cirugía era una de las circunstancias más comunes entre ellos.

Nosotros no encontramos asociación entre estos factores probablemente debido al escaso número de casos en ambas circunstancias, pero consideramos que quizá la presencia de FV Leiden suponga un riesgo latente que precipitaría un episodio trombótico, al actuar el estrés quirúrgico a modo de gatillo desencadenante.

Traumatismo

En nuestro modelo de trombosis, el hecho de sufrir un traumatismo eleva el riesgo trombótico. El 16% (4/25) de los sujetos expuestos a este riesgo era portador de FV Leiden. Se trataba de 4 pacientes con un alelo FV:Q506 que sufrieron trombosis postraumática a una edad muy temprana (la media de edad fue 27,75 años).

Tras una lesión traumática, las concentraciones circulantes en sangre de fibrinógeno y FVIII aumentan 5 veces. El incremento fisiopatológico de la viscosidad de la sangre debido al aumento de estos dos factores está asociado a riesgo trombótico [228]. FV Leiden y traumatismo combinados supondrían un elevado riesgo de trombosis, aunque de nuevo el estudio de asociación no resultó significativo probablemente debido al escaso número de casos encontrados en esta doble situación de riesgo.

Inmovilización

La inmovilización supone un riesgo muy elevado de sufrir trombosis. En nuestra serie, el 19,23% (5/26) de los sujetos expuestos al riesgo de

inmovilización eran portadores de FV Leiden. Encontramos una asociación entre ambos factores aunque no alcanzó la significación estadística.

Neoplasia

El riesgo calculado en nuestro estudio para la neoplasia como factor de riesgo protrombótico carece de fiabilidad estadística. La causa es que sólo contábamos con un sujeto control en esta circunstancia para poder contrastarlo con el grupo de pacientes. No obstante, de 8 pacientes con neoplasia, uno de ellos resultó ser portador de FV Leiden. Se trataba de una joven de 17 años con un primer episodio de TVP. Los otros 7 pacientes no portadores presentaban una media de edad en el momento del estudio de 51,42 años. Quizá la asociación de ambos factores de riesgo hayan provocado un proceso trombótico a una edad llamativamente temprana.

Una de las razones más frecuentes para sufrir trombosis idiopática es un proceso de cáncer oculto. Éste es identificado en un 6-25% de los pacientes diagnosticados de TVP espontánea [229,230]. Se observa una dificultad para la fluidez circulatoria debido a una mayor viscosidad de la sangre por el aumento de fibrinógeno y del número de células circulantes. También se genera un estado pretrombótico como consecuencia de la liberación de sustancias procoagulantes desde el tejido maligno [231]. No hay casi estudios que contemplen una posible asociación entre ambos factores. En un trabajo realizado por Sifontes y cols. [232] observaron que FV Leiden no juega un papel importante en la incidencia de trombosis en niños con cáncer. Nosotros encontramos asociación pero no alcanzó significación estadística. Como hemos comentado anteriormente, no podemos extraer conclusiones definitivas por los pocos sujetos control expuestos a este factor de riesgo en nuestro estudio.

Embarazo

En nuestro estudio, el período de embarazo supone un importante riesgo de TEV para el sexo femenino. El período de gestación es considerado factor de riesgo para trombosis en los pacientes con déficits de ATIII, PC o PS [233]. También es un factor de riesgo común en pacientes de TEV con RPCA

[111,234-236]. En un estudio caso-control, el 60% de las mujeres embarazadas con TEV estaban afectadas por una RPCA [237]. En otros estudios se obtuvieron frecuencias similares [238,239]. En nuestra serie de pacientes, solamente encontramos una mujer portadora de FV Leiden entre 14 embarazadas con TEV (7,14%). Esta cifra es baja comparada con la descrita en la mayoría de los estudios, pero de nuevo este resultado podría ser achacable al tamaño muestral de mujeres sometidas a esta condición. Quizá si aumentáramos el número de pacientes analizados en estado de gestación cambiaría el valor de esta prevalencia.

Lindqvist y cols observaron la incidencia de TEV en el 28% de los embarazos en mujeres afectas de RPCA. Por otra parte, volviendo al concepto que ya ha sido mencionado antes, también se ha propuesto un efecto beneficioso de la RPCA en cuanto que podría reducir las complicaciones hemorrágicas en el parto [225].

Con respecto al riesgo de pérdidas fetales sufridas por mujeres portadoras del alelo FV:Q506, se publicó un amplio estudio sobre trombofilia hereditaria en el que no encontraban diferencias significativas ni en relación con abortos en los dos primeros trimestres del embarazo ni respecto a los fetos nacidos sin vida [240]. No obstante, son varios los trabajos que no apoyan esta teoría. Estos autores encuentran una fuerte asociación entre FV Leiden y pérdida fetal [241] sobre todo durante las primeras 20 semanas de gestación [242]. Incluso se ha visto una influencia por parte de FV Leiden en el riesgo de recurrir en la pérdida fetal [242,243].

Anticonceptivos orales

El riesgo atribuido al tratamiento de contraceptivos fue mayor al de mujeres no tratadas. Nuestros datos coinciden con el riesgo establecido para este factor (casi 4 veces mayor) [244,245]. El riesgo estimado para la presencia de ambos factores se expresa en la tabla XXVI.

Tabla XXVI: Riesgo estimado de desarrollar TEV en mujeres debido a múltiples factores de riesgo. La mutación FV Leiden puede encontrarse ausente (-) o presente como defecto heterocigoto u homocigoto [120,246,247].

FV Leiden	Anticonceptivos orales	Riesgo relativo	Nº Factores de riesgo	Publicación
-	-	1	0	
Heterocigoto	-	7	1	[122]
-	+	4	1	[244,245]
Heterocigoto	+	35	2	[246,248]
Homocigoto	-	50	2	[120]
Homocigoto	+	>100	3	[249]

De 15 pacientes con TEV de sexo femenino que recibían tratamiento con anticonceptivos orales, cinco presentaban fenotipo resistente a la PCA (33,33%), de las cuales cuatro resultaron portadoras de la mutación FV Leiden (26,66%). Dicho de otro modo, observamos que el 28,57% (4/14) de las pacientes portadoras de la mutación Leiden presentaba la ingesta de anticonceptivos orales como factor de riesgo adicional en el momento de sufrir trombosis. Realmente es una cifra elevada que nos da una idea de la agresividad trombotica de la combinación de estos factores.

La influencia de las hormonas en el sistema de la PC está bien documentada [250]. Las mujeres generalmente tienen niveles más bajos de PS que los hombres. Una alta concentración de estrógenos, por ejemplo debido a tratamiento con anticonceptivos orales o a terapia postmenopáusica sustitutoria, pueden provocar una reducción en la concentración de PS y por tanto una reducción en el potencial del sistema de la PC [251,252]. Este efecto puede ser intensificado por un aumento en los niveles de C4b-BP, que son regulados por el estado hormonal, disminuyendo la concentración de PS libre [253]. Se han realizado estudios que confirman que las mujeres que toman la píldora tienen un potencial anticoagulante PC-dependiente significativamente más bajo que aquéllas que no la toman [251]. Esto es llamado “resistencia a la

proteína C adquirida”, y podría explicar la observación epidemiológica de un aumento de riesgo de TEV en usuarias de anticonceptivos orales, en especial los llamados de tercera generación [254]. Éstos (menor dosis de progestágenos) están asociados con un aumento de generación de trombina y reducida sensibilidad a la PCA [254], siendo ésta más pronunciada en los sujetos portadores del alelo FV:Q506 [248].

Un estudio realizado por Schamberck y cols. [255] confirmó que el alelo FV:Q506 es un importante factor de riesgo para desarrollar trombosis en asociación con contraceptivos orales. Además, consideran frecuentes otros factores de riesgo adquiridos como cirugía, traumatismo e inmovilización prolongada en mujeres portadoras durante tratamiento con anticonceptivos orales duplicándose así el riesgo de desarrollo de TEV.

Ha sido debatida la necesidad de realizar un cribaje de portadoras de esta mutación a todas las mujeres candidatas al uso de anticonceptivos orales [255-257]. Esta idea se desestimó porque desde el punto de vista económico, la relación coste-beneficio es claramente desfavorable [258].

Anticuerpos antifosfolípido y anticoagulante lúpico

Entre los 204 pacientes estudiados, nueve presentaban síndrome antifosfolípido (4,41%). De estos nueve individuos solamente uno era portador del alelo FV:Q506 (11,11%). No encontramos una asociación entre FV Leiden y la presencia de anticuerpos antifosfolípido.

Fue detectado anticoagulante lúpico en cuatro pacientes pero ninguno de ellos era portador de FV Leiden, a pesar de que dos de ellos presentaban fenotipo resistente a la PCA. No encontramos asociación entre la presencia de FV Leiden y anticoagulante lúpico.

Tanto el síndrome antifosfolípido como el anticoagulante lúpico son reflejo de una anomalía autoinmune. La reducción de PC y PS, así como el aumento de C4b-BP observados en desórdenes autoinmunes pueden deberse a un proceso inflamatorio oculto [259]. La unión del anticoagulante lúpico a complejos fosfolípido-proteína puede producir una reducción de la capacidad

del sistema de la PC. Quizá esta unión interfiere en la activación de la PC por el complejo trombina-trombomodulina [260], o quizá compita con los complejos PCA/PS para formar superficies procoagulantes [261]. Tanto en un caso como en otro, la consecuencia podría ser una RPCA adquirida [262-265]. Esto explicaría el hecho de que en nuestro estudio hayamos encontrado dos sujetos con anticoagulante lúpico, fenotipo resistente a la PCA y ausencia de FV Leiden. No obstante, también hay estudios en los que no encuentran una correlación entre el fenotipo resistente a la PCA, presencia de anticoagulante lúpico y anticuerpos antifosfolípido [266]. De hecho, no se ha detectado la anomalía FV Leiden en mayor grado entre los pacientes con lupus anticoagulante que entre los que no la tienen, sugiriendo así que FV:Q506 no es un factor de riesgo común en esta situación [267,268].

En nuestra serie de pacientes portadores del alelo FV:Q506, el 71,42% presentaba al menos un factor de riesgo adquirido. Esta cifra es elevada y nos permite reincidir en la teoría multifactorial del TEV.

Factores de riesgo congénitos

El descubrimiento de la RPCA y de la causa genética que se le asocia, el FV:Q506, ha venido a confirmar la idea de que el TEV, sobre todo el que se presenta con más intensidad, es una enfermedad típicamente poligénica. Hasta hace relativamente poco tiempo, el fenotipo de trombosis hereditaria se contemplaba como un trastorno debido a un único gen, cuyas prevalencias estimadas se presentan en la figura 39:

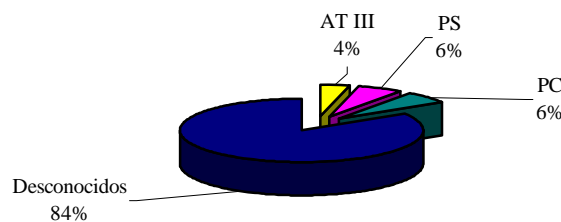


Figura 39: Factores de riesgo congénito para TEV antes de descubrir la RPCA. (Modificada de Kraus y cols. [269]).

El descubrimiento de la RPCA en 1993 [62] supuso un cambio importante en

el concepto de la trombofilia congénita, como puede verse en la figura 40.

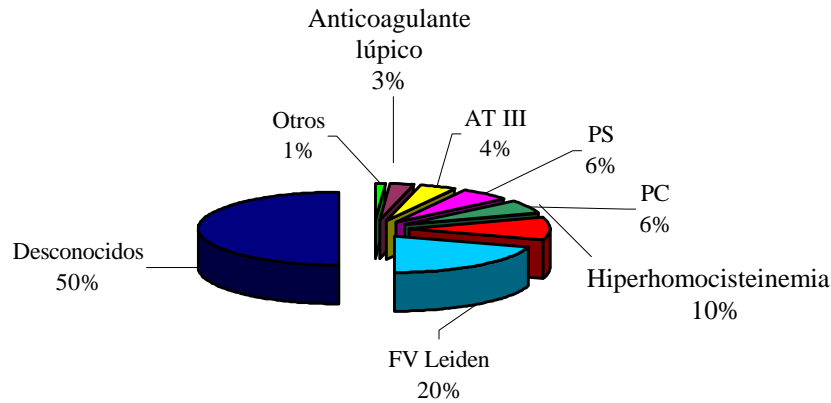


Figura 40: Prevalencia de los defectos que afectan al balance hemostático en pacientes de TEV a edad <45 años o en localización inusual. Tomada de Kraus, M. [269].

Déficit de PC, PS o ATIII

En nuestra serie de pacientes, solamente dos presentaban un déficit de PC, tres de PS y dos de ATIII. Ninguno de ellos era portador de FV Leiden. Por tanto, no encontramos asociación entre ninguno de estos tres factores de riesgo congénito y FV Leiden. No obstante, hemos de considerar que el número de sujetos con estas anomalías congénitas analizado en el estudio actual fue bajo, así que no resultó fácil encontrar déficits combinados. Si aumentáramos el número de pacientes probablemente obtendríamos unos resultados distintos.

Al poco tiempo de describirse la RPCA, se realizaron estudios en los que se observaba una alta prevalencia de FV Leiden en familias deficientes en PC. Esta prevalencia varía según el estudio entre el 6 y el 43% [43,270-272]. En cambio, no se registran déficits combinados en etnias no europeas [271]. En cuanto al déficit de PS, también se habla de cifras de asociación elevadas alrededor del 30% [44,114,272]. No obstante, es necesario tener en cuenta que la RPCA interfiere en la determinación de la PS funcional y puede dar lugar a

falsos positivos [273-277]. Con respecto al déficit de ATIII y FV Leiden, se han descrito casos aislados de portadores de ambos defectos [278,279]. El efecto sinérgico de déficit de AT III con la mutación FV Leiden parece ser de gran importancia

Se ha comprobado que la presencia de asociación del alelo FV:Q506 con déficit de PC [30,43], de PS [114,280,281] o AT III [117,282] de forma combinada, supone un factor de riesgo mayor que el proporcionado por cada una de ellas por separado.

RPCA

Encontramos 27 pacientes con TEV fenotípicamente resistentes a la PCA. La anomalía genética FV Leiden solamente estaba presente en 21 de ellos (77,77%). Aparte de ser el alelo FV:Q506 la principal causa de RPCA (en el 80% de los casos), esta respuesta deficiente a la acción anticoagulante de la PCA puede tener un origen distinto [283]. La RPCA no causada por FV Leiden también es un factor de riesgo para TEV [284]. De los seis sujetos con RPCA no portadores de FV Leiden, uno de ellos era una mujer de 44 años en estado de gestación. Se sabe que en ausencia de la mutación Leiden, una gran parte de las mujeres embarazadas desarrollan RPCA adquirida [285,286]. La respuesta a la PCA va disminuyendo a lo largo de la gestación y se recupera después del parto [287,288]. Otro caso se trató de una mujer que estaba recibiendo tratamiento con anticonceptivos orales. Se han realizado estudios que confirman que algunas mujeres que toman contraceptivos desarrollan “resistencia a la proteína C activada adquirida”, pudiendo explicarse así un aumento de la incidencia de TEV en usuarias de anticonceptivos orales [254]. Otros dos casos presentaban anticoagulante lúpico. Como se ha mencionado anteriormente, la unión del anticoagulante lúpico a complejos fosfolípido-proteína podría desencadenar una RPCA adquirida [262]. Los últimos dos casos referían antecedentes familiares de TEV. Sería interesante analizar el resto del genoma de estos pacientes, porque aparte de la RPCA adquirida y la provocada por FV Leiden, otras anomalías genéticas diferentes podrían ser también causa de este fenotipo resistente. Por ejemplo, los sujetos

homocigotos para déficit de FV [289]. También un haplotipo del FV denominado HR2 (unión de seis polimorfismos en FV) provoca esta respuesta deficiente a la PCA [290,291], aunque su frecuencia es similar en pacientes con TEV que en controles sanos, así que no parece suponer un factor de riesgo trombótico [290]. Williamson y cols. [113] descubrieron una nueva mutación en el gen del FV asociada a la RPCA. Fue denominada FV Cambridge (FV:R306T), pero parece ser una mutación muy poco frecuente. En Hong Kong encontraron otra mutación que también afecta a la Arginina en posición 306 del FV (FV Hong Kong, FV:R306G) [112], y que supone un factor de riesgo para TEV. Cualquiera de estas anomalías conocidas hasta el momento, o cualquiera que esté todavía por descubrir, podría ser la causa de la RPCA de estos dos pacientes con antecedentes familiares de TEV.

V 1.5 Edad del primer episodio trombótico

Los resultados obtenidos en nuestro estudio reflejan que la presencia de FV Leiden adelantaría el primer episodio de trombosis unos ocho años ($\beta=8,406$). La media de edad a la que los portadores de FV Leiden sufrían su primer episodio trombótico fue 30 años frente a 43 en los no portadores.

García-Gala y cols [108] publicaron resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio. Encontraron que los portadores de FV Leiden presentaban un primer evento trombótico a una edad más joven (35 años) que los pacientes sin esta mutación (44 años). Middeldorp y cols. [215] también observan una diferencia significativa entre portadores (41 años) y no portadores (48 años). En este estudio analizaron 437 familiares de primer grado de 112 pacientes heterocigotos para FV Leiden y 30 familiares de seis pacientes homocigotos. Encontraron que el riesgo relativo supuesto por el FV Leiden es mayor en el grupo joven (15-30 años), y lo justificaron por una mayor incidencia de factores de riesgo entre las mujeres jóvenes (embarazo y anticonceptivos orales) que ayudan al FV Leiden a desencadenar un episodio trombótico. En nuestro estudio, el 7,14% de las mujeres portadoras (1/14) se encontraba en estado de embarazo y el 28,57% (4/14) tomaban tratamiento anticonceptivo.

Los dos casos homocigotos contemplados en nuestro estudio experimentaron un primer episodio a los 17 y 30 años. En el primer caso, la paciente presentaba un proceso de neoplasia como posible factor de riesgo desencadenante. El segundo caso no presentaba factores adicionales aparentes de riesgo trombótico. Chafa y cols. [292] describieron dos pacientes homocigotos para FV Leiden cuyos primeros episodios trombóticos se desarrollaron a los 20 y 36 años. Uno de ellos tampoco presentaba factores de riesgo adicionales. El otro caso se trataba de una mujer embarazada. Greengard y cols. [5] describieron una familia portadora de esta anomalía genética. Dos hijos homocigotos presentaban historia de recurrencia trombótica cuyo primer episodio se desencadenó a los 16 y 18 años. Un hijo heterocigoto también sufrió TEV espontáneo a los 23 años que recurrió 7 años más tarde.

Todos estos datos nos permiten concluir que el FV Leiden es un factor de riesgo precipitante de episodios trombóticos a una edad prematura. Hay ocasiones en las que parece ser la única anomalía trombótica presente, aunque es probable que coexista otra anomalía genética desconocida hasta el momento.

V 1.6 FV Leiden como factor de recurrencia trombótica

La influencia de FV Leiden en la recurrencia trombótica no resultó estadísticamente significativa en nuestro estudio. No obstante, observamos que un 12,96% de los pacientes que habían sufrido una recaída trombótica eran portadores del alelo 1691A frente a un 9,52% de los casos no recurrentes, hecho que nos impide descartar la idea de que el FV Leiden facilite la recurrencia trombótica.

Hay estudios que defienden la teoría de que los pacientes portadores de la mutación FV Leiden que han sufrido un primer episodio, tienen un mayor riesgo de experimentar recurrencia trombótica [293,294]. Sin embargo esta teoría se presta a discusión ya que también hay trabajos que no evidencian un riesgo más elevado de recurrencia en estos pacientes [108,295,296].

Lindmarker y cols. [297] descubrieron una mayor tendencia a la recurrencia en los casos portadores de FV Leiden de forma homocigota que en los casos no portadores. Esta diferencia resultó no significativa entre los sujetos portadores de un único alelo 1691A y los no portadores. En un estudio realizado por Emmerich y cols. [217] se analizaron los episodios trombóticos de 36 pacientes homocigotos para FV Leiden, llegando a la conclusión de que la homocigosis para esta mutación se encuentra asociada a un alto riesgo de trombosis recurrente. Greengard y cols. [5] describieron una familia portadora de esta anomalía cuyos familiares homocigotos y heterocigotos experimentaban sucesivos episodios de TV o EP a edades prematuras y en ausencia de factores de riesgo adicionales. En nuestra serie de pacientes, los dos casos de homocigosis presentaban una clara penetrancia clínica para TEV. Uno de ellos se trataba de una joven de 17 años que solamente había referido un episodio de TVP. Debido a su corta edad es probable que no haya tenido todavía la oportunidad de sufrir una recaída trombótica. El segundo caso se trataba de una mujer que a los 30 años sufrió un primer episodio de TVP que recurrió a los 33 años, sin causas aparentes, sufriendo TVP en la misma localización. Sin embargo, la naturaleza retrospectiva de nuestro estudio y el no haber tenido en cuenta la duración del tratamiento anticoagulante recibido por los pacientes en estudio, podrían influir en los resultados. Nuestros datos dejan las puertas abiertas a un estudio prospectivo a largo plazo, con una cohorte de pacientes consecutivos diagnosticados de primer episodio de TEV. También se deberían tener en cuenta ciertos aspectos como que el período más frecuente de un segundo episodio trombótico parece ser durante los dos primeros años tras recibir el tratamiento anticoagulante, o también el hecho de que aquellos pacientes cuyo primer episodio se trataba de TEV idiopático tienen más tendencia a la recurrencia que aquellos que sufrieron TEV secundario [298,299]. Actualmente no existen trabajos en la literatura que hayan tenido en cuenta todas estas consideraciones.

V 2. PROTROMBINA G20210A

V 2.1 Prevalencia en la población control

La prevalencia estimada de Protrombina G20210A en la población control fue algo más baja en la población control total que en la población navarra (frecuencia alélica 1,77 y 2,23%, respectivamente).

Son muchos los trabajos publicados para definir la distribución geográfica de Protrombina G20210A (Tabla XXVII). La prevalencia varía entre 0 y 6,5% en los distintos estudios. Si asumiéramos una homogeneidad, la prevalencia mundial sería 2,3% [134] aunque esta distribución uniforme no es real.

Tabla XXVII: Distribución geográfica de Protrombina G20210A.

Europa		
País	Nº sujetos en estudio	Frec alélica (%)
Grecia [300]	160	2,2
Israel [134]	1.081	2,8
Argelia [301]	110	1,36
Suecia [144]	282	0,88
Hungría [302]	407	1,4
Alemania [303]	450	2,0
Gran Bretaña [137,140]	672	1,34
Islandia [138]	108	0,5
Italia [302,304,305]	779	1,9
Holanda [124]	474	1,2
Groenlandia [306]	478	0
Francia [134]	398	2,2
Bélgica [307]	100	1,0
España		
Barcelona [142]	201	6,5
Murcia [141]	291	0,7
Asturias [143]	200	1,7
Navarra [185]	304	2,14
Asia		
China-Taiwan [308]	149	0
Japón [136]	255	0
Africa		
Población africana [134]	300	0,33
América		
Brasil [309,310]	695	0,9

En Europa se barajan cifras que difieren poco entre los distintos países. Rosendaal y cols. observaron, sin embargo, que en el sur y occidente la prevalencia media es 3,0% mientras que en el norte es 1,7% [134]. Estas diferencias geográficas pueden ser el resultado de una selección asociada a la interacción gen-ambiente, teniendo en cuenta que los factores de riesgo adquiridos varían de un país a otro. No obstante, el hecho de que la distribución de G20210A sea más uniforme que en el caso de FV Leiden, sugiere un único origen de Protrombina G20210A y probablemente anterior a FV Leiden [309]. Este polimorfismo no es común entre la raza no caucásica, por lo que se estima su origen hace 21-34.000 años, tras la separación entre la población africana y no africana y la población caucásica de la asiática [201]. Zivelin [311] confirmó la teoría de un único origen para este polimorfismo mediante el análisis de haplotipos en el gen del factor II.

La frecuencia alélica estima que es predecible un caso homocigoto entre 10.000 [134], por lo que no resulta extraño encontrar muy pocos casos descritos de portadores de Protrombina G20210A en homocigosis.

V 2.2 Prevalencia en la población con TEV

La frecuencia alélica estimada de Protrombina G20210A en el grupo de pacientes con TEV estudiado por nosotros fue 6,13%. De los 204 pacientes analizados, 23 portaban el polimorfismo de forma heterocigota y uno de forma homocigota. Así, la frecuencia del genotipo homocigoto fue 0,49% (1/204).

La mayoría de los estudios realizados en Europa encuentra una frecuencia alélica entre 2 y 3,5% [137,139,140,144,301,304,309], bastante inferior a la descrita en este trabajo. La prevalencia de Protrombina G20210A en estos estudios es más elevada que en la población control, y no difiere de la descrita por Poort y cols. (3,1%) [124]. Poort y cols. [124] analizaron la prevalencia de este polimorfismo en dos grupos de pacientes. El primero estaba formado por 28 pacientes seleccionados, con historia familiar de trombosis venosa. El segundo grupo contaba con 474 pacientes consecutivos no seleccionados. Las frecuencias alélicas estimadas fueron 8,9 y 3,1%

respectivamente. La alta proporción entre los pacientes del primer grupo se vio afectada por la selección realizada. A pesar de que la mayoría de los estudios presentan cifras de prevalencia similares, hay trabajos como el realizado por Dilley y cols. [312] en Atlanta, en el que la frecuencia alélica hallada fue muy baja (1,1%), o como el realizado por Cattaneo y cols. [305] en Italia, en el que la frecuencia alélica fue muy alta (8,05%). En España también se han realizado estudios donde, generalmente la prevalencia es más alta que la encontrada en otros países (Tabla XXVIII), más en consonancia con nuestros resultados. Incluso un trabajo realizado por Souto y cols. [142] afirma que Protrombina G20210A es el factor genético de riesgo trombótico más común en su área geográfica.

Tabla XXVIII: Estudios realizados en España sobre la prevalencia de Protrombina G20210A en la población con TEV.

Área española	Nº pacientes con TEV	Frecuencia alélica
Barcelona [142]	116	8,62%
Asturias [143]	82	7,92%
Murcia [141]	82	3,66%
Navarra (trabajo actual)	204	6,13%

En Murcia, la prevalencia encontrada es menor que en el resto de los estudios españoles, pero aún y todo, destaca con respecto al resto de Europa. El hecho de que Protrombina G20210A sea tan prevalente en los casos de TEV en nuestro medio, nos lleva a considerar a esta mutación, al menos a priori, como un factor de riesgo protrombótico importante.

Analizamos una posible asociación entre la presencia de Protrombina G20210A y el sexo de los portadores. En nuestro trabajo este polimorfismo es prácticamente igual de prevalente en el sexo femenino (12,6%) que en el

masculino (11,0%). Nuestros resultados comparten esta idea con los trabajos de Poort y cols. [124] y de Vargas y cols. [143].

Respecto a la localización de la patología trombótica, observamos que un 12,59% de los pacientes con TV, un 11,11% de los pacientes con EP y un 8,69% de aquellos con ambas patologías presentaban el alelo mutado. Aunque es algo más elevada la prevalencia para los casos de TV, también hay que tener en cuenta que tuvimos más acceso a pacientes con TV que con EP. Como las diferencias encontradas son tan pequeñas, quizá al aumentar el número de pacientes con EP la cifra llegaría a igualarse. Vargas y cols. [143] no encontraron diferencias significativas con el tipo de patología desarrollada entre los portadores y no portadores del defecto. Ferraresi y cols. [146] también describen un predominio de TVP y EP entre su población de pacientes con Protrombina G20210A.

V 2.3 Protrombina G20210A como factor de riesgo de TEV

Nuestros resultados sugieren que Protrombina G20210A supone un incremento del riesgo de TEV de 2,5 veces. Sin embargo, conviene no perder de vista que esta O.R. no está avalada por una significación estadística, aun estando ésta próxima, lo cual confirma que este polimorfismo parece constituir un factor de riesgo menos agresivo que FV Leiden como vamos a discutir a continuación.

Cuando Poort y cols. [124] describieron esta variante en la secuencia del gen de la protrombina, estimaron que incrementaba el riesgo trombótico casi tres veces. De este modo, lo definían como un moderado factor de riesgo. Han sido publicados algunos trabajos que consideran este polimorfismo como un importante factor, que supone un incremento de riesgo desde cuatro hasta casi nueve veces en los portadores de esta anomalía [137,144,305]. Sin embargo, Protrombina G20210A generalmente es mencionado como un leve factor de riesgo (O.R.=1,2-3) [142,312,313], que necesita la presencia de otros factores para provocar un estado trombogénico [142,304]. Nuestros resultados comparten esta teoría, ya que, aunque hayamos encontrado casos en nuestra

serie sin ningún factor de riesgo adicional aparente, podría estar influyendo cualquier defecto genético no contemplado en nuestro estudio o aún por descubrir.

No son muchos los casos descritos de sujetos homocigotos para Protrombina G20210A. Un estudio realizado en Francia [150] nos presentaba una familia con dos homocigotos y cuatro heterocigotos para este polimorfismo. Los dos homocigotos habían experimentado severos episodios trombóticos de forma temprana y espontánea, y dos de los heterocigotos, trombosis venosa superficial. No obstante, también son comunes los casos descritos como sujetos homocigotos libres de historia personal y familiar de TEV [301] aun habiéndose expuesto a situaciones de importante riesgo como cirugía e inmovilización [314]. Incluso en un estudio familiar se descubrió, por casualidad, un caso homocigoto de 72 años de edad, que había superado sin complicaciones trombóticas importantes operaciones quirúrgicas a los 62 y 64 años con posterior encamamiento y sin ningún tipo de profilaxis anticoagulante [151]. Este caso nos indica que Protrombina G20210A parece compatible con la longevidad. Aunque hay poca bibliografía que apoye esta idea, parece evidente que este polimorfismo no es causa de mortalidad, al menos por sí solo.

Nosotros encontramos una mujer homocigótica para Protrombina G20210A que realmente presentaba un cuadro severo de recurrencia trombótica. Este caso no nos permite concluir nada acerca de la agresividad del polimorfismo, ya que no era ésta la única anomalía genética presente. Quizá fuera su interacción con FV Leiden y con la ingesta de anticonceptivos orales la condición desencadenante de su estado trombogénico.

Definir Protrombina G20210A como factor de riesgo es causa de controversia. El hecho de que la sustitución G→A se produzca en el extremo 3' no traducido significa que las proteína sintetizadas por los genotipos GG, GA y AA, en un principio deben ser idénticas. Es necesario conocer el mecanismo por el cual este polimorfismo supondría un factor de riesgo trombótico. Poort y cols. [124] descubrieron una asociación entre este

polimorfismo y una elevada concentración de protrombina plasmática. Esta elevada concentración de protrombina podría suponer, por sí sola, un factor de riesgo trombogénico. Quizá este aumento de la proteína sea consecuencia del polimorfismo, o quizá sea otro el factor responsable que se encuentre en ligamiento génico con Protrombina G20210A. Poort y cols. no pudieron justificar un mecanismo por el cual Protrombina G20210A contribuiría a una mayor generación de esta proteína.

V 2.4 Asociación con otros factores de riesgo

Protrombina G20210A parece ser un factor de riesgo leve para TEV, por lo que se cree necesaria la presencia de otro factor adicional para desencadenar un episodio trombótico [142].

Factores de riesgo adquiridos

Cirugía, traumatismo e inmovilización

Un 18,42% (7/38) de los pacientes que habían sufrido un episodio trombótico tras una operación quirúrgica eran portadores de Protrombina G20210A. Eran 7 pacientes cuya edad media fue 44,71 años, no llamativamente temprana.

No se han realizado grandes estudios en los que se relacione Protrombina G20210A con el riesgo quirúrgico. Aunque se han descrito casos en los que ambos factores de riesgo se asocian a TEV de localización inusual [315], también se han descrito casos de portadores de este polimorfismo de forma homocigota que han superado operaciones, en ausencia de tratamiento anticoagulante, sin desarrollar trombosis [151,314].

Nuestros datos, en principio, no apoyarían la idea de que la combinación de ambas situaciones de riesgo sea especialmente agresiva, debido a que entre los siete pacientes se daban otras circunstancias adicionales tales como traumatismo, inmovilización, obesidad y presencia de antecedentes familiares.

El 20% (5/25) de los pacientes que habían sufrido trombosis asociada a traumatismo eran portadores de Protrombina G20210A. La media de edad de

estos 5 sujetos fue 39,0 años. Este porcentaje de portadores fue similar entre los pacientes que se encontraban en periodo de inmovilización (5/26=19,23%) aunque en esta ocasión la media de edad fue mucho más elevada (49,5 años).

Lo que resulta llamativo es que el 58,33% de los pacientes portadores del alelo G20210A habían sufrido trombosis en presencia de una de estas tres situaciones de riesgo. Esto nos lleva a confirmar que Protrombina G20210A necesita la presencia de otros factores trombogénicos para desencadenar un episodio de trombosis. Este polimorfismo, en cualquiera de las tres circunstancias, contribuiría a la trombogénesis reflejando de este modo el carácter multifactorial de esta enfermedad.

Embarazo y puerperio

En nuestro estudio se dio un caso de TVP asociada a embarazo (1/14=7,14%) y dos casos relacionados con el periodo de puerperio (2/5=40%) en portadoras del alelo 20210A. Nuestros datos coinciden con los valores de prevalencia hallados en otros estudios. Kupfermink y cols. observaron que un 10% de las mujeres que sufrían complicaciones trombóticas durante el embarazo eran portadoras del alelo 20210A [316] y Grandone y cols. [317] encontraron un 31,0% de portadoras del polimorfismo entre 42 pacientes de TEV asociado a embarazo o postparto. Si juntamos estos dos factores de riesgo (embarazo y puerperio), el 15,79% (3/19) de las mujeres estudiadas por nosotros presentaba el alelo 20210A. No hay muchos estudios en la literatura sobre estos dos factores de riesgo tomados en conjunto (embarazo-puerperio y G20210A) por lo que no podemos contrastar más nuestros resultados.

Anticonceptivos orales

Un 20% de las mujeres con TEV que estaban recibiendo tratamiento anticonceptivo eran portadoras del polimorfismo Protrombina G20210A (3/15). En el grupo control, sólo encontramos dos mujeres en tratamiento anticonceptivo que presentaban el alelo 20210A. Martinelli y cols. [318] describieron un estudio en el cual, el tratamiento con anticonceptivos orales en mujeres portadoras del polimorfismo, elevaba en gran medida el riesgo de trombosis. Nosotros encontramos un elevado porcentaje de mujeres jóvenes

con TEV a raíz de ser expuestas a ambos factores de riesgo. Esto podría permitirnos intuir una cierta asociación, pero, probablemente debido al escaso número de pacientes en esta situación, prácticamente similar al encontrado en entre los sujetos sanos, el estudio estadístico resultó no significativo.

Se han descrito casos en los que la presencia de ambos riesgos parece provocar TV cerebral a una edad joven.

Anticuerpos antifosfolípido y Anticoagulante lúpico

Ninguno de los 9 pacientes afectados por la presencia de anticuerpos antifosfolípido ni de los 4 con anticoagulante lúpico portaban el alelo 20210A. No encontramos, por tanto, ninguna asociación entre cualquiera de estos factores adquiridos y la presencia del polimorfismo. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en dos trabajos realizados por Bentolila y cols. [319,320]. Por lo tanto, en principio consideraríamos que serían factores independientes de riesgo trombogénico.

En nuestra serie de pacientes portadores del polimorfismo, el 75% estaba expuesto al menos a un factor de riesgo adquirido adicional. Este dato nos da una idea de la agresividad del alelo 20210A, ya que parece necesitar la presencia de otro factor de riesgo para desencadenar un episodio trombótico. Este resultado apoya una vez más la teoría multigénica y multifactorial del TEV.

Factores de riesgo congénitos

Déficit de PC, PS o AT III

Como ya se ha comentado anteriormente, son muy pocos los pacientes hallados en nuestro trabajo con estos déficits. Ninguno de los siete (dos deficitarios de PC, tres en PS y dos en AT III) era portador del polimorfismo Protrombina G20210A. La mayoría de los estudios realizados en este sentido se basan en el análisis molecular del polimorfismo en familias con trombofilia congénita. El alelo 20210A es más prevalente en familias con tendencia

trombótica que en familias sin historia de trombosis [321,322]. Sin embargo, no se encuentra una mayor frecuencia de familias con déficit de PC [323,324]. En cuanto al déficit de AT III, Van Boven y cols. [282] encuentran un factor de riesgo genético adicional (FV Leiden o Protrombina G20210A) en más de la mitad de las familias portadoras de esta anomalía, y calculan el efecto de la exposición a ambos defectos en un aumento de la incidencia de trombosis 5 veces mayor.

Los estudios que se deberían realizar en esta línea deben basarse en la búsqueda de otros defectos genéticos que quizá cosegreden con los conocidos hasta el momento. Quizá cuando atribuimos un riesgo estimado a una anomalía genética estamos cometiendo el error de no poder controlar la influencia de la fracción del genoma que cosegrega con ella.

RPCA

Entre nuestra serie de pacientes con TEV encontramos dos casos portadores del alelo 20210A con fenotipo resistente a la PCA (2/24=8,33%), y mutación FV Leiden de forma simultánea.

Smirnov y cols. [325] sugirieron que la protrombina puede ser un importante inhibidor fisiológico de la inactivación del FVa por la PCA. Así, una inhibición de la actividad anticoagulante de la PCA añadida a un posible estado hipercoagulable inducido por una elevada generación de trombina, incrementaría en gran medida el riesgo trombótico.

V 2.5 Edad del primer episodio trombótico

Nuestros resultados proponen una misma edad al sufrir el primer episodio trombótico para portadores y no portadores de Protrombina G20210A. En nuestro estudio, la media de esta edad observada en portadores fue 37,0 años frente a 43,0 años en no portadores. A pesar de que el episodio de TEV inicial ocurre a una edad más temprana en individuos con el alelo 20210A, las diferencias no resultaron significativas.

No disponemos de muchos estudios previos con datos clínicos sobre las características de los episodios trombóticos en los pacientes con esta

alteración, pero la mayoría observan lo mismo que nosotros. Vargas y cols. [143] tampoco encontraron diferencias significativas entre la edad de presentación del primer episodio trombótico para los portadores con respecto a los no portadores del polimorfismo (45,2 años frente a 41,5). Aunque Ferraresi y cols. [146] observaron una edad de primera trombosis de 30,5 años entre los portadores frente a 36 años entre no portadores, realizaron su estudio sobre una población con TEV muy seleccionada, lo cual pudo influir en el sentido de ofrecer una población trombótica excesivamente joven. A pesar de ello, en dicho trabajo también se describían pacientes portadores del polimorfismo que no presentaron su primer episodio trombótico hasta los 77 años. Makris y cols. [322] también confirman nuestros resultados, ya que la edad en los sujetos portadores era más joven (28,8 años) que en los no portadores (35,6 años) pero no llegaba a alcanzar significación estadística.

Hay estudios publicados que aseguran observar un incremento de riesgo trombótico debido a Protrombina G20210A conforme avanza la edad. Hillarp y cols. [144] no encontraron pacientes menores de 62 años portadores del polimorfismo. No obstante, estos resultados pueden deberse al escaso número de sujetos jóvenes entre los 99 pacientes en estudio (la media de edad fue 64 años). Rosendaal y cols. [326] respondieron a este estudio presentando un trabajo que encuentra el polimorfismo en todos los grupos de distinta edad. Cumming y cols. [137] también apoyan este aumento del riesgo entre un grupo de mayor edad aunque no llegaron a conclusiones tan drásticas como Hillarp y cols. En nuestro trabajo, el polimorfismo se ha encontrado distribuido de modo uniforme independientemente de la edad. Esta misma idea es la que sugerían Poort y cols. [124] en el estudio original, y fue apoyada por el estudio de Cumming y cols. [137] y Leroyer y cols. [139]. Estos datos pueden ser un reflejo de la poca agresividad del polimorfismo. Protrombina G20210A no parece ser causa de selección natural.

En nuestro estudio solamente hemos descubierto una mujer portadora de este polimorfismo de forma homocigótica. Presentaba historia personal de recurrencia trombótica habiendo sufrido su primer episodio a los 38 años de

edad. No podemos achacar este cuadro trombótico únicamente al polimorfismo ya que a su vez coexistía la anomalía FV Leiden de forma heterocigota además de factores de riesgo adquiridos.

Zawadzki y cols. [150] describieron una familia francesa portadora de Protrombina G20210A. Dos homocigotos habían experimentado severos episodios trombóticos de forma espontánea, uno a los 30 años (EP) y el otro a los 40 años (TVP + EP). No obstante, son varios los casos de homocigosis descritos que no han sufrido ningún episodio trombótico. Girolami y cols. [314] describieron dos casos portadores de dos alelos 20210A que, aun habiendo estado expuestos a situaciones de riesgo trombótico (cirugía, inmovilización), no habían experimentado trombosis. No obstante, se trataba de dos sujetos todavía muy jóvenes (15 y 21 años). Sería interesante seguir la posible historia trombótica de estos sujetos con el paso de los años. El caso descrito por Alatri y cols. [151] de un sujeto homocigoto descubierto por casualidad a los 72 años de edad sin ningún tipo de historia personal de TEV, indica que Protrombina G20210A es compatible con una vida larga sin complicaciones trombogénicas.

Nuestros datos apoyan la idea de que Protrombina G20210A es un factor de riesgo muy leve, con poco riesgo de desencadenar manifestaciones trombóticas a una edad prematura en ausencia de otras situaciones de riesgo.

V 2.6 Protrombina G20210A y recurrencia de TEV

Nuestros resultados ponen de manifiesto que Protrombina G20210A no aumenta el riesgo de recurrencia trombótica. No obstante, el 15,09% de los casos recurrentes estudiados portaban el alelo 20210A, frente al 10,88% de los casos que han sufrido un único evento de TEV.

Makris y cols. [322] observaron que de 46 pacientes con historia de un único episodio trombótico, el 2,1% resultó portador del alelo 20210A, frente a un 31,3% en 16 pacientes con historia de recurrencia trombótica, aunque el escaso número de enfermos incluido en el estudio, así como la selección de éstos, obliga a interpretar con mucha cautela sus resultados. No obstante, éstos

son también apoyados por De Stefano y cols. [321], al encontrar una mayor prevalencia del polimorfismo en pacientes con trombofilia congénita y tendencia a recurrencia trombótica. En contraste, hay estudios recientes realizados con un gran número de pacientes que afirman no encontrar diferencias en este aspecto entre portadores y no portadores. Eichinger y cols. [327] realizaron un estudio prospectivo con 492 pacientes diagnosticados de TEV. Tras 24 ± 16 meses a partir de finalizar el tratamiento anticoagulante prescrito, un 7% de los sujetos portadores experimentó recaída trombótica, frente a un 12% en no portadores. Lindmarker y cols. [297] llegaron a la misma conclusión analizando 456 pacientes con TEV. Estos estudios no justifican, por tanto, terapia anticoagulante prolongada en los portadores heterocigotos de Protrombina G20210A.

Como se ha señalado anteriormente, este polimorfismo parece ser un factor de riesgo leve para TEV que probablemente necesita la “ayuda” de otros factores para desencadenar un episodio trombótico. Los estudios que encuentran más prevalente el alelo 20210A en la población recurrente también encuentran una asociación entre este polimorfismo y trombofilia congénita [321,322]. Es probable, por tanto, que Protrombina G20210A no sea capaz, por sí sola, de provocar una recaída trombótica, pero al encontrarse acompañada de otro defecto hemostático podría producirse un efecto sinérgico que predispusiera a la recurrencia. Nuestros resultados no apoyan la posibilidad de que este defecto genético facilite por sí mismo una recurrencia trombótica, pero deja las puertas abiertas a un nuevo estudio prospectivo a largo plazo, que permitiría obtener resultados más concluyentes.

V 3. FV LEIDEN Y PROTROMBINA G20210A

V 3.1 Prevalencia en la población control

Entre la población sin TEV no encontramos ningún caso portador de ambas anomalías genéticas combinadas. Por tanto, la prevalencia tanto en la población control general como en la población navarra resultó ser 0%. En la literatura no se han descrito sujetos carentes de historia personal o familiar de TEV y portadores de ambos defectos.

V 3.2 Prevalencia en la población con TEV

En nuestra serie de pacientes con TEV encontramos dos casos doblemente portadores de FV Leiden y Protrombina G20210A. La prevalencia hallada de ambos alelos asociados fue 0,98% (2/204), valor similar al estadísticamente esperado por la frecuencia de cada mutación [328].

Se han realizado varios estudios en los que se analiza el polimorfismo Protrombina G20210A en sujetos portadores de FV Leiden. Alhenc-Gelas y cols. [329] no encontraron ningún portador entre 155 sujetos heterocigotos para FV Leiden pertenecientes a 26 familias, sugiriendo así, ausencia de interacción gen-gen entre los defectos FV Leiden y Protrombina G20210A. Ehrenforth y cols. [205] y Zöller y cols. [330] discrepan con este estudio anterior. Éstos encuentran que la doble heterocigosis está presente aproximadamente en un 13% de los sujetos portadores de FV Leiden y achacan el resultado de Alhenc-Gelas a un sesgo en la selección de los casos. Teniendo en cuenta que FV Leiden es poco frecuente en nuestra área geográfica, el hecho de encontrar dos sujetos doblemente portadores de un total de 25 portadores de FV Leiden (8%), nos permite apoyar la idea de una asociación entre ambas mutaciones.

Poort y cols. [124] realizaron el cálculo a la inversa. De todos los sujetos portadores de Protrombina G20210A, el 40% de ellos también era portador del defecto FV Leiden. En nuestra serie, solamente el 8,3% de los 20210A era

doble portador (2/24). Este porcentaje no es muy elevado pero, como hemos comentado anteriormente, teniendo en cuenta la baja prevalencia de FV Leiden en nuestra área, el hecho de encontrar dos pacientes de TEV con el doble defecto genético nos hace apoyar la hipótesis de la asociación.

V 3.3 Ambas mutaciones como factor de riesgo de TEV

Es interesante observar que ambos pacientes con los dos defectos genéticos combinados presentaron una severa expresión clínica de trombofilia.

El primer caso se trataba de una mujer de 32 años de edad, que a los 26 años había experimentado un primer proceso de TVP de forma espontánea. A los 32 años sufrió una recaída trombótica en el parto de su primer hijo. Presentaba historia familiar de TEV. Al analizar posibles factores de riesgo hereditarios encontramos que PC, PS y ATIII se encontraban dentro de los límites normales. En contraste, hallamos una respuesta defectuosa a la proteína C activada. El análisis genético reveló un doble estado heterocigoto para las mutaciones FV Leiden y Protrombina G20210A.

El segundo caso se trataba de una mujer de 44 años de edad. Había sido operada de sinusitis a los 25 años y había tenido dos hijos (dos exposiciones, por tanto, a embarazo, parto y puerperio) sin complicaciones. No presentaba historia personal de abortos. A los 38 años, tras sufrir una fractura traumática de tobillo izquierdo, se le recomendó un periodo de inmovilización durante tres semanas. Al reiniciar la vida normal sufrió un episodio de TVP que fue cediendo con mejoría gradual, hasta la recuperación total al cabo de un año. A los 40 años sufrió una hemorragia cerebral sin causa aparente. Se le prescribió reposo entre otras medidas. A las dos semanas de inmovilización refirió TVP con complicaciones embólicas. La paciente tomaba anovulatorios desde hacía 15 años. En esta ocasión, no se le pudo administrar tratamiento anticoagulante debido a su antecedente de hemorragia cerebral. A los meses experimentó flebitis en el brazo izquierdo. Se le detectó la presencia de síndrome antifosfolípido (IgG=32 GPL/mL), probablemente como efecto secundario de la medicación ya que a los tres años se repitió el análisis resultando negativo.

El resto de la analítica de posibles factores de riesgo hereditarios se encontraba dentro de los límites de la normalidad, exceptuando una deficiente respuesta a la PCA. El análisis molecular evidenció la presencia de FV Leiden de forma heterocigota y Protrombina G20210A en homocigosis.

Pocos estudios han podido estimar el riesgo trombótico para los sujetos doblemente portadores, ya que no es fácil encontrar estos casos en la población control. Ehrenforth y cols. [205] proponen que el hecho de portar ambas anomalías incrementa tres veces el riesgo ya establecido para un heterocigoto de FV Leiden. Zöller y cols. [330] consideran que la heterocigosis combinada supone un riesgo similar al que se ve expuesto un caso homocigoto para FV Leiden.

Las historias personales de trombosis de las dos mujeres que nosotros hallamos dobles portadoras revelaban en ambos casos un cuadro de trombofilia severa. Consideramos que en ambos casos, su carga genética ha jugado un papel importante en el desarrollo de episodios trombóticos. No obstante, a pesar de que la primera sufrió un primer episodio idiopático, la recurrencia fue provocada por una situación de alto riesgo trombótico (parto). El segundo caso desarrolló eventos trombogénicos siempre en presencia de situaciones de riesgo adicionales (traumatismo, inmovilización, anticonceptivos orales, síndrome antifosfolípido). En la literatura se han descrito casos doble portadores cuyo primer episodio de trombosis se desarrolló en ausencia de cualquier factor de riesgo adicional aparente. Por ejemplo, el caso de un varón de 21 años que sufrió TVP de una forma espontánea en una pierna. A los 6 meses, tras tratamiento anticoagulante, refirió TVP en la misma localización [331]. No obstante, son más comunes los casos que, aun presentando las dos anomalías genéticas, han necesitado la “ayuda” de un factor desencadenante adicional para la manifestación de trombosis como son el tratamiento con anovulatorios [331], inmovilización o embarazo [328], lo que nos hace volver de nuevo a la teoría multigénica, por la cual más de un defecto hereditario sería un requisito imprescindible para experimentar trombosis, que se originaría en presencia de un factor de riesgo ambiental adicional, que actuaría de gatillo [99]. Ahondando en esta idea,

aunque los resultados de nuestro estudio incluyan solamente los datos de dos sujetos, nos permiten apoyar la idea de Zöller y cols. [330] de que los individuos con defectos genéticos combinados tienen mayor riesgo de trombosis que aquellos que presentan un único defecto. El hecho de considerar al FV Leiden como mutación más agresiva, nos lleva a concluir que la presencia simultánea de Protrombina G20210A como factor adicional de riesgo genético, facilita la expresión del fenotipo trombofílico en pacientes con FV Leiden, el cual, a pesar de predisponer a TEV, poseería por sí solo una baja penetrancia clínica.

V 3.4 Ambas mutaciones y edad del primer episodio de TEV

Los dos casos que hemos descrito reponen al perfil de trombosis severa a edad temprana, el primer caso a los 26 años y el segundo a los 38 años, aunque conviene no perder de vista que una de ellas estuvo expuesta varias veces a situaciones de riesgo durante las cuales no desarrolló patología trombofílica. Zöller y cols. [330] consideraron que los individuos con ambos defectos genéticos combinados tendían a ser más jóvenes en el momento del primer episodio trombofílico que aquellos portadores únicamente de FV Leiden, a pesar de que en su estudio las diferencias no resultaron significativas (28 ± 3 frente a 37 ± 15 años en los casos no doblemente portadores). Ehrenforth y cols. [205] también describieron en estos casos una media de edad del primer evento de 27 años, menor que en los portadores de FV Leiden.

Debido a lo poco frecuente que es la coexistencia de ambas mutaciones, no es posible realizar análisis con poder estadístico. Por ello, sólo podemos describir los casos encontrados y buscar una asociación entre la presencia de ambas anomalías genéticas y el desarrollo de trombosis a edades prematuras. Prisco y cols. [331] y Veyradier y cols. [328] describieron 4 sujetos en los que la presencia simultánea de los dos defectos hereditarios parece permitir la expresión de trombofilia a una edad temprana (21, 23, 26 y 31 años). Howard y cols. [332] también propusieron que la coexistencia de estas dos variantes genéticas podría incrementar la expresividad clínica de trombosis

constituyendo un mecanismo de trombofilia en pacientes jóvenes.

Es conocido que la incidencia de la trombosis depende en gran medida de la edad, siendo una patología rara entre la juventud, y más común entre la población mayor. Según las conclusiones del estudio LETS (The Leiden Thrombophilia Study) [333], entre los sujetos menores de 40 años, aquellos que presenten un factor de riesgo tienen 2,4 veces más posibilidad de sufrir trombosis que aquellos que no lo presenten. La presencia de dos factores de riesgo aumentaría la probabilidad a 7,7 veces y tres o más hasta 20 veces. Una relación similar se observaría también en la gente mayor, a diferencia de que si en la gente joven se requerirían varios factores de riesgo para que ocurriera la trombosis, en individuos mayores de 55 años sucedería a menudo con sólo uno o dos factores presentes. Nuestros dos casos eran jóvenes en el momento de sufrir su primer episodio trombótico, que se desencadenó como respuesta a la presencia de al menos dos defectos genéticos combinados y, además, coincidiendo en uno de los pacientes con un factor de riesgo adquirido. Estos casos enfatizan el efecto sinérgico de la asociación de varios factores de riesgo en la patogénesis de TEV. Asumimos, por tanto, la teoría de que una mayor proporción de anomalías hemostáticas combinadas predisponen a la trombofilia a una edad más temprana.

V 3.5 Ambas mutaciones y recurrencia de TEV

Ambos casos dobles portadores sufrieron recaída trombótica a una edad temprana. No obstante, siempre se dieron circunstancias protrombóticas adicionales que muy probablemente ayudaron a desencadenar esta recurrencia.

Los dos casos descritos por Prisco y cols. [331] también habían sufrido varios episodios de trombosis. Un varón con 21 años había sufrido TVP espontánea en una pierna y recurrió a los 6 meses con TVP en la misma localización. Una mujer experimentó TVP en una pierna a los 23 años, y un nuevo episodio a los 25 años durante el período de puerperio, a pesar de estar recibiendo profilaxis con heparina. Veyradier y cols. [328] describieron también dos casos. Uno de ellos, un varón de 31 años que, a partir de un

primer episodio de TVP tras inmovilización, sufrió tres episodios de TVP y EP a los 46, 54 y 55 años. El otro caso se trataba de una mujer que, a los 26 años, sufrió TVP con EP durante un embarazo y posteriormente experimentó tres episodios de TVP, complicado uno de ellos con EP a los 36, 39 y 58 años.

Como se puede comprobar, aunque no sean muchos los casos descritos, es cierto que todos ellos están asociados a severos cuadros clínicos de trombosis y recurrencia.

De Stefano y cols. [296] realizaron un estudio retrospectivo en el que analizaron 624 pacientes con diagnóstico documentado de un primer episodio trombótico. Encontraron 17 sujetos portadores de ambos defectos genéticos. Concluyeron que estos sujetos presentan un mayor riesgo de recurrencia. Margaglioni y cols. [334] también analizaron 542 pacientes con un primer episodio de TEV, considerando que la probabilidad de recurrencia fue significativamente mayor en los portadores de ambas mutaciones, llegando a ser comparable a la observada en los sujetos con déficits de proteínas anticoagulantes naturales o en presencia de anticuerpos antifosfolípido. Ninguno de estos estudios se atreve a confirmar la necesidad de un tratamiento anticoagulante prolongado para estos pacientes, a pesar de intuir un elevado riesgo de recurrencia. La causa es que ambos autores reconocen las limitaciones de sus estudios, y proponen realizar trabajos prospectivos a largo plazo con un número significativo de pacientes. Lensing y Prins [335] propusieron un nuevo enfoque para los estudios encaminados a resolver una posible influencia de ambas mutaciones en la recurrencia trombótica. Consideraron que se cometen graves e importantes errores en el diseño de los mismos. En su opinión, en un estudio retrospectivo se aplican numerosos sesgos, que incluirían una inadecuada identificación de la recurrencia trombótica, distinta exposición de los sujetos al tratamiento anticoagulante, selección de los pacientes... Sería necesario contar con una adecuada documentación de los eventos sufridos (aunque debemos tener presente que el diagnóstico clínico es altamente inespecífico), ya que la localización y la naturaleza del primer episodio trombótico podría condicionar mucho la

propensión a la recurrencia trombótica.

Resulta interesante destacar que la única variable que en nuestra serie de pacientes elevó el riesgo de recurrencia trombótica fue la presencia de historia familiar de TEV. Este resultado nos hace insistir una vez más, en que la carga genética de un individuo juega un papel muy importante en el desarrollo de un estado protrombótico. No podemos controlar la influencia del resto del genoma en nuestros pacientes, pero sí podemos intuir que la coexistencia de otros factores genéticos, aún desconocidos o no estudiados en nuestro grupo, podría provocar la expresión de un fenotipo trombótico concreto. Puede ser ésta la explicación a la variabilidad encontrada según las distintas manifestaciones de TEV, resultando por tanto difícil generalizar un tratamiento para los casos portadores de uno o dos defectos hemostáticos.

V 4. POSIBLES MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE HIPERCOAGULABILIDAD EN LA MUTACIÓN PROTROMBINA G20210A

La mutación Protrombina G20210A se produce en el extremo 3' no traducido del gen de la protrombina. Esto significa que, en un principio, la proteína resultante debería ser idéntica estructural y funcionalmente, a la traducida desde el genotipo GG. El hecho de que la protrombina sintetizada en un individuo con el alelo 20210A no provoque una anomalía en su función hace difícil encontrar el mecanismo por el cual este polimorfismo pueda resultar un factor de riesgo trombótico. Nosotros hemos tratado de ver, de una parte, si la mutación se asocia a cambios en los niveles plasmáticos del factor II y, de otra, si se produce un aumento de la formación de trombina y/o fibrina en los sujetos que presentan la mutación, lo que sería sinónimo de la existencia de un estado de hipercoagulabilidad.

Protrombina G20210A y FII:C

Observamos un aumento de la concentración plasmática de protrombina en aquellos pacientes portadores del polimorfismo respecto a los no portadores. El hecho de no encontrar este aumento en los sujetos sanos portadores nos impide asociar la presencia del alelo 20210A a una elevada concentración de FII:C. Sin embargo, nuestros resultados se podrían interpretar en el sentido de que los portadores de la mutación que, como consecuencia de ella o por otra razón, presentan un aumento de la concentración plasmática de protrombina, tienen un elevado riesgo de trombosis, mientras que en aquellos sujetos que presentando la mutación no tienen aumento de protrombina no existe dicho aumento del riesgo de trombosis.

En el estudio original [124], Poort y cols. observaron que el 87% de los portadores del polimorfismo presentaban niveles mayores de 1,15 U/ml (31% de los pacientes y 20% de los controles). Varios estudios apoyan esta idea como el de Makris y cols. [322], Ferraresi y cols. [146] o Bloem y cols. [336].

No obstante, Makris y cols. [322] registran esta diferencia en ocho sujetos portadores del polimorfismo comparados con 113 sujetos no portadores. Lo destacable es que estos ocho portadores eran siete pacientes con TEV y un sujeto control. Quizá sus resultados no difieran de los nuestros, que también observamos un aumento de la concentración plasmática de protrombina en el grupo de pacientes con TEV.

Simioni y cols. [337] también ven esta diferencia, pero observan que entre los no portadores, aquellos que habían sufrido trombosis también presentaban un nivel plasmático más elevado que en los controles. Es reseñable, además, que encontraron dos controles homocigotos para 20210A con una concentración más baja de lo esperado (0,96 U/ml y 1,37 U/ml). En otros casos de heterocigosis también encontraron niveles de protrombina normales o algo más bajos. Por ello, concluyen en su trabajo que estas diferencias, probablemente debidas a la variabilidad entre individuos, impiden afirmar sin reservas que Protrombina G20210A está asociada a un aumento de protrombina plasmática. Nosotros compartimos esta misma idea, ya que en nuestro estudio observamos una gran variabilidad entre los resultados hallados en cada grupo.

Poort y cols. [124] observaron que el hecho de presentar niveles más elevados de protrombina, en sí, ya supone un factor de riesgo de trombosis. Sugerían que quizá otros factores, además del alelo 20210A, podrían ser responsables de este alto nivel de protrombina. El por qué esta elevada concentración supone un aumento de riesgo trombótico no está todavía claro. Puede ser que provoque un desequilibrio entre los sistemas procoagulante, anticoagulante y fibrinolítico. Un aumento de protrombina permitiría una mayor generación de trombina, y podría dar lugar a un excesivo crecimiento de coágulos de fibrina. Esta idea fue confirmada por Franco y cols. [310] en cuyo estudio se asocia la presencia del alelo 20210A con hiperprotrombinemia e incremento de generación de trombina. El estudio de Bovill y cols. [323] es interesante porque aunque sí notaron un aumento en la concentración de protrombina en los sujetos portadores de este polimorfismo (tanto pacientes como controles), también observaron que ni la presencia de la variante

genética ni la concentración plasmática fueron asociados a un incremento de riesgo de trombosis. Estos hallazgos no coinciden con los nuestros, que sugieren que los niveles plasmáticos de protrombina están condicionados por la mutación de forma diferente según el sujeto sea paciente o control, destacando así el aumento de los niveles de protrombina en los pacientes portadores de la mutación, no así en el grupo de controles portadores. En un estudio de Girolami y cols. [314] se describieron dos jóvenes homocigotos para esta variante genética sin historia personal de TEV, cuyos niveles de protrombina, al igual que en el caso descrito en el párrafo anterior [328], eran más bajos de lo esperado (106 y 113%).

Quizá 20210A protrombina no siempre suponga un aumento en la concentración de protrombina, o quizá sea esta mutación pero en asociación con otros factores, la responsable del alto nivel de proteína [124]. No obstante, defendemos la existencia de una variabilidad entre individuos que es necesario aclarar, así como el hecho de que la combinación de hiperprotrombinemia y presencia del alelo 20210A supone un factor de riesgo trombótico.

Protrombina G20210A y marcadores de hipercoagulabilidad

Nuestros resultados evidencian que no existen diferencias entre los sujetos portadores y no portadores del polimorfismo en cuanto a niveles de F1+2, TAT y DD, lo que indicaría que, en los sujetos portadores del polimorfismo estudiados por nosotros, no hemos podido evidenciar un aumento de la generación de trombina y/o fibrina.

No hay casi estudios en la literatura en los que se hayan analizado estos marcadores en ausencia/presencia del polimorfismo Protrombina G20210A. Franco y cols. [310] compararon los niveles de F1+2, TAT y DD en siete portadores del alelo 20210A y 256 no portadores, todos ellos con diagnóstico de trombosis venosa y/o arterial. Los resultados que obtuvo se expresan en la tabla XXIX. Ellos concluyeron su estudio evidenciando una asociación de la mutación con una excesiva generación de trombina. Quisiéramos destacar que en este estudio analizaron pacientes tanto con trombosis venosa como arterial.

Pacientes con este último diagnóstico no han sido contemplados en nuestro estudio, lo cual, podría tal vez explicar las diferencias entre los resultados que estamos describiendo y los nuestros. Además, el pequeño tamaño de la muestra del trabajo citado en cuanto a portadores de la mutación, y la gran discordancia en el número de portadores y no portadores analizado, podría no reflejar fielmente la realidad. Nosotros hemos estudiado un número considerablemente mayor de portadores y el mismo número de no portadores, por lo que consideraríamos que nuestro estudio tiene un más alto grado de fiabilidad.

Tabla XXIX: Niveles de F1+2, TAT y DD (media \pm DE) en portadores y no portadores del alelo 20210A protrombina en el estudio de Franco y cols. [310].

Marcador	Genotipo		p
	GG (n=256)	GA (n=7)	
TAT ($\mu\text{g/L}$)	6 \pm 1	19 \pm 9	0,02
F1+2 (nmol/L)	1 \pm 0,1	1,5 \pm 0,3	0,02
Dímero D ($\mu\text{g/L}$)	253 \pm 14	334 \pm 101	0,39

¿Cuál es, por tanto, el mecanismo patogénico de G20210A? El hecho de que no hayamos encontrado diferencias significativas en ninguno de los tres marcadores analizados, no hace descartar que G20210A sea capaz de inducir un estado hipercoagulable, ya que hoy por hoy no existe un marcador inequívoco de hipercoagulabilidad. Simplemente, nuestro experimento no aporta información adicional sobre el mecanismo de acción de este polimorfismo. Por lo tanto, habrá que continuar, de momento, examinando otras posibilidades. Tal vez haya que plantearse que, al menos parcialmente, podría venir mediada por el TAFI. Este inhibidor fibrinolítico, al que cada vez se está concediendo más relevancia fisiopatológica, es activado por el complejo trombina-trombomodulina [98]. Es tentador pensar que, en una condición en la que probablemente se tenga una capacidad mayor de generar trombina, la actividad TAFI pueda ser mayor, descendiendo así la actividad fibrinolítica. Esta inhibición de la fibrinólisis añadida al estado

hipercoagulable del individuo provocaría el cuadro trombótico. Evidentemente, esto no es más que una hipótesis que sería interesante aclarar en un trabajo posterior.

COMENTARIO FINAL

En este trabajo hemos tratado de cuantificar el riesgo que conlleva el ser portador de dos mutaciones, FV Leiden y Protrombina G20210A, de dos moléculas del sistema hemostático. No queremos finalizar sin hacer mención a que, hoy por hoy, la caracterización de nuevas mutaciones en moléculas implicadas en la hemostasia, seguida del consiguiente estudio epidemiológico para evaluar su agresividad protrombótica, centra la mayor parte de los esfuerzos en la investigación en este campo. Según la severidad del defecto estudiado (basada en la edad del primer episodio trombótico y la prevalencia entre la población afectada), el riesgo es definido como excesivo, alto, intermedio o bajo [338]. Sin embargo, la categorización del riesgo según la anomalía de un solo gen no puede ser muy fiel a la realidad, en vista de las distintas manifestaciones de trombosis observadas en miembros de familias afectadas con genotipo idéntico. Aunque en algunas instancias, esta heterogeneidad podría deberse a las posibles y variables exposiciones de los pacientes afectados a circunstancias protrombóticas adquiridas, tales como cirugía, embarazo o uso de anticonceptivos orales, la mayoría de las veces no existe aún una explicación clara.

Por lo tanto, estas observaciones hacen muy factible la hipótesis de que, entre miembros de familias afectadas por un gen mutado concreto, pueda influir la cosegregación de otros factores de riesgo genéticos que contribuirían decisivamente al fenotipo trombofílico. La más que probable veracidad, por lo tanto, de la teoría multigénica del origen de la trombosis, seguirá concitando gran parte de los esfuerzos en la investigación en este campo en los próximos años. No obstante, dichos esfuerzos no deberían centrarse únicamente en el aspecto epidemiológico, ya que los hallazgos que se puedan derivar de éste no aportan soluciones para el abordaje terapéutico. Por lo tanto, se deben investigar con la misma intensidad los mecanismos fisiopatológicos por los cuales los polimorfismos incrementan el riesgo trombótico.

VI. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas tras la realización de este trabajo fueron las siguientes:

1. La prevalencia del Factor V Leiden en la población autóctona navarra es significativamente menor a la observada en el resto de países occidentales, y muy similar a la del País Vasco y Aquitania.
2. La prevalencia del Factor V Leiden en la población con TEV es significativamente mayor que la hallada en la población control, por lo que el FV Leiden constituye un factor de riesgo de enfermedad tromboembólica.
3. El Factor V Leiden probablemente requiera la presencia de otros factores genéticos y/o ambientales adicionales para desencadenar un episodio trombótico.
4. El Factor V Leiden adelanta la aparición del primer episodio tromboembólico.
5. El Factor V Leiden no incrementa el riesgo de recurrencia trombótica, aunque sería necesario realizar un estudio prospectivo para confirmar este resultado.
6. La prevalencia de la mutación G20210A del gen de la protrombina en Navarra es similar a la hallada en otros estudios realizados el sur de Europa.
7. La Protrombina G20210A se asocia a la patología tromboembólica y podría constituir un factor de riesgo trombótico, aunque más leve que Factor V Leiden, y siempre en presencia de otros factores de riesgo adicionales.
8. La Protrombina G20210A no adelanta la aparición del primer episodio tromboembólico.
9. La Protrombina G20210A no incrementa el riesgo de recurrencia trombótica, aunque sería necesario realizar un estudio prospectivo para confirmar este resultado.
10. La combinación en un mismo sujeto de Factor V Leiden y protrombina G20210A supone un riesgo de tromboembolismo venoso más elevado que el correspondiente a cada una de ellas por separado.

11. La Protrombina G20210A está asociada a niveles elevados de FII:C sólo en los pacientes de tromboembolismo venoso, y no en los portadores del grupo control. Este hecho podría sugerir que el episodio trombótico se desencadena cuando existe una combinación de la mutación G20210A de la protrombina con un aumento de los niveles de FII:C, cuyo origen podría no ser la propia mutación.
12. La Protrombina G20210A no se asocia al incremento de los niveles de F1+2, TAT, ni dímero D, aunque esto no nos permite descartar que la mutación induzca un estado hipercoagulable.

VII. Bibliografía

- [1] Nordfang O, Valentin S, Beck TC, Hedner U. Inhibition of extrinsic pathway inhibitor shortens the coagulation time of normal plasma and of hemophilic plasma. *Thromb Haemost* 1991; 66: 464-467.
- [2] Marcum JA, McKenney JB, Rosenberg RD. Acceleration of thrombin-antithrombin complex formation in rat hindquarters via heparinlike molecules bound to the endothelium. *J Clin Invest* 1984; 74: 341-50.
- [3] Marcum JA, Rosenberg RD. Heparinlike molecules with anticoagulant activity are synthesized by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 126: 365-72.
- [4] Bertina RM, Koeleman BP, Koster T *et al.* Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C . *Nature* 1994; 369: 64-7.
- [5] Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernandez JA, Griffin JH, Evatt B. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 1994; 343: 1361-2.
- [6] Voorberg Jan RJ, Koopman R, Büller H, Berends F, ten Cate Jan W, Mertens K, van Mourik J. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506 of factor V. *The Lancet* 1994; 343: 1535-1536.
- [7] Dahlback B. The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis. *Thromb Res* 1995; 77: 1-43.
- [8] Marlar RA, Kressin DC, Madden RM. Contribution of plasma proteinase inhibitors to the regulation of activated protein C in plasma. *Thromb Haemost* 1993; 69: 16-20.
- [9] Stenflo J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J Biol Chem* 1976; 251: 355-63.
- [10] Kisiel W. Human plasma protein C: isolation, characterization, and mechanism of activation by alpha-thrombin. *J Clin Invest* 1979; 64: 761-9.

- [11] Long GL, Belagaje RM, MacGillivray RT. Cloning and sequencing of liver cDNA coding for bovine protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 5653-6.
- [12] Foster D, Davie EW. Characterization of a cDNA coding for human protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 4766-70.
- [13] Stenflo J, Fernlund P. Amino acid sequence of the heavy chain of bovine protein C. *J Biol Chem* 1982; 257: 12180-90.
- [14] Fernlund P, Stenflo J. Amino acid sequence of the light chain of bovine protein C. *J Biol Chem* 1982; 257: 12170-9.
- [15] Beckmann RJ, Schmidt RJ, Santerre RF, Plutzky J, Crabtree GR, Long GL. The structure and evolution of a 461 amino acid human protein C precursor and its messenger RNA, based upon the DNA sequence of cloned human liver cDNAs. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 5233-47.
- [16] Kurosawa S, Galvin JB, Esmon NL, Esmon CT. Proteolytic formation and properties of functional domains of thrombomodulin. *J Biol Chem* 1987; 262: 2206-12.
- [17] Ohlin AK, Landes G, Bourdon P, Oppenheimer C, Wydro R, Stenflo J. Beta-hydroxyaspartic acid in the first epidermal growth factor-like domain of protein C. Its role in Ca²⁺ binding and biological activity. *J Biol Chem* 1988; 263: 19240-8.
- [18] Ohlin AK, Bjork I, Stenflo J. Proteolytic formation and properties of a fragment of protein C containing the gamma-carboxyglutamic acid rich domain and the EGF-like region. *Biochemistry* 1990; 29: 644-51.
- [19] Kisiel W, Canfield WM, Ericsson LH, Davie EW. Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. *Biochemistry* 1977; 16: 5824-31.
- [20] Esmon CT. Cell mediated events that control blood coagulation and vascular injury. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 1-26.
- [21] Liu LW, Rezaie AR, Carson CW, Esmon NL, Esmon CT. Occupancy of anion binding exosite 2 on thrombin determines Ca²⁺ dependence of protein C activation. *J Biol Chem* 1994; 269: 11807-12.

- [22] Ye J, Rezaie AR, Esmon CT. Glycosaminoglycan contributions to both protein C activation and thrombin inhibition involve a common arginine-rich site in thrombin that includes residues arginine 93, 97, and 101. *J Biol Chem* 1994; 269: 17965-70.
- [23] Dahlback B. Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood* 1995; 85: 607-14.
- [24] Dahlbäck B, Stenflo J in: The molecular basis of blood diseases. (Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varmus HA, Majerus PW, Varmus H, Ed.) WB Saunders, Philadelphia, (1994).
- [25] Kierkegaard A. Incidence of acute deep vein thrombosis in two districts. A phlebographic study. *Acta Chir Scand* 1980; 146: 267.
- [26] Anderson FA, Jr., Wheeler HB, Goldberg RJ *et al.* A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study. *Arch Intern Med* 1991; 151: 933-8.
- [27] Schafer AI. Hypercoagulable states: molecular genetics to clinical practice. *Lancet* 1994; 344: 1739-42.
- [28] Nachman RL, Silverstein R. Hypercoagulable states. *Ann Intern Med* 1993; 119: 819-27.
- [29] Miletich JP, Prescott SM, White R, Majerus PW, Bovill EG. Inherited predisposition to thrombosis. *Cell* 1993; 72: 477-80.
- [30] Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA *et al.* Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 1996; 76: 651-62.
- [31] Hirsh J. Hypercoagulability. *Semin Hematol* 1977; 14: 409-25.
- [32] Schafer AI. The hypercoagulable states. *Ann Intern Med* 1985; 102: 814-28.
- [33] Paramo JA, Cuesta B, Fernandez J, Alfaro MJ, Paloma MJ, Rocha E. Thrombosis and hypercoagulable states. *Rev Med Univ Navarra* 1987; 31: 233-7.

- [34] Paramo JA, Rocha E. Hypercoagulability and thrombophilic states. *Sangre* 1991; 36: 477-85.
- [35] Rodgers GM, Shuman MA. Congenital thrombotic disorders. *Am J Hematol* 1986; 21: 419-30.
- [36] Guidelines on the investigation and management of thrombophilia. The British Committee for Standards in Haematology. *J Clin Pathol* 1990; 43: 703-9.
- [37] Vicente V, Rivera J, Corral J, Moraleda JM. Other congenital hypercoagulable states. *Sangre* 1997; 42: 467-74.
- [38] Aiach M, Gandrille S, Emmerich J. A review of mutations causing deficiencies of antithrombin, protein C and protein S. *Thromb Haemost* 1995; 74: 81-9.
- [39] Cooper DN. The molecular genetics of familial venous thrombosis. *Baillieres Clin Haematol* 1994; 7: 637-74.
- [40] De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management . *Blood* 1996; 87: 3531-44.
- [41] Vicente V, Lozano M, Rivera J. Estados de hipercoagulabilidad. *Clin Med Esp* 1996; 1: 27-51.
- [42] Gandrille S, Greengard JS, 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. The French Network on the behalf of INSERM. *Blood* 1995; 86: 219-24.
- [43] Koeleman BP, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C-deficient families. *Blood* 1994; 84: 1031-5.
- [44] Koeleman BP, van Rump D, Hamulyak K, Reitsma PH, Bertina RM. Factor V Leiden: an additional risk factor for thrombosis in protein S deficient families? *Thromb Haemost* 1995; 74: 580-3.
- [45] Bernardi F, Legnani C, Micheletti F *et al.* A heparin cofactor II mutation (HCII Rimini) combined with factor V Leiden or type I protein C

- deficiency in two unrelated thrombophilic subjects. *Thromb Haemost* 1996; 76: 505-9.
- [46] De Stefano V, Leone G, Mastrangelo S *et al.* Thrombosis during pregnancy and surgery in patients with congenital deficiency of antithrombin III, protein C, protein S. *Thromb Haemost* 1994; 71: 799-800.
- [47] Tabertero MD, Tomas JF, Alberca I, Orfao A, Lopez Borrasca A, Vicente V. Incidence and clinical characteristics of hereditary disorders associated with venous thrombosis. *Am J Hematol* 1991; 36: 249-54.
- [48] Vicente V, Moraleda JM. Primary thrombophilia and pregnancy. *Med Clin Barc* 1993; 100: 217-9.
- [49] Vicente V, Rodriguez C, Soto I, Fernandez M, Moraleda JM. Risk of thrombosis during pregnancy and post-partum in hereditary thrombophilia. *Am J Hematol* 1994; 46: 151-2.
- [50] Malm J, Laurell M, Nilsson IM, Dahlback B. Thromboembolic disease--critical evaluation of laboratory investigation . *Thromb Haemost* 1992; 68: 7-13.
- [51] D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. *Blood* 1997; 90: 1-11.
- [52] Rocha E, Montes R, Hermida J, Orbe I, Zabalegui N. Other acquired hypercoagulable states. *Sangre* 1997; 42: 483-92.
- [53] Rocha E, Montes R, Panizo C *et al.* Diagnóstico y tratamiento de los estados de hipercoagulabilidad. *Hematol Citocinas Inmunoter Ter Cel* 1999; 2: 1-32.
- [54] Teitel JM, Bauer KA, Lau HK, Rosenberg RD. Studies of the prothrombin activation pathway utilizing radioimmunoassays for the F2/F1 + 2 fragment and thrombin--antithrombin complex. *Blood* 1982; 59: 1086-97.
- [55] Pelzer H, Schwarz A, Stuber W. Determination of human prothrombin activation fragment 1 + 2 in plasma with an antibody against a synthetic peptide . *Thromb Haemost* 1991; 65: 153-9.

- [56] Bauer KA, Weiss LM, Sparrow D, Vokonas PS, Rosenberg RD. Aging-associated changes in indices of thrombin generation and protein C activation in humans. Normative Aging Study. *J Clin Invest* 1987; 80: 1527-34.
- [57] Pelzer H, Schwarz A, Heimburger N. Determination of human thrombin-antithrombin III complex in plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Thromb Haemost* 1988; 59: 101-6.
- [58] Nossel HL, Yudelman I, Canfield RE *et al.* Measurement of fibrinopeptide A in human blood. *J Clin Invest* 1974; 54: 43-53.
- [59] Amiral J, Walenga JM, Fareed J. Development and performance characteristics of a competitive enzyme immunoassay for fibrinopeptide A. *Semin Thromb Hemost* 1984; 10: 228-42.
- [60] Dale S, Gogstad GO, Brosstad F *et al.* Comparison of three D-dimer assays for the diagnosis of DVT:ELISA, latex and an immunofiltration assay (NycoCard D-Dimer). *Thromb Haemost* 1994; 71: 270-4.
- [61] Heijboer H, Brandjes DP, Buller HR, Sturk A, ten Cate JW. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1990; 323: 1512-6.
- [62] 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 U S A* 1993; 90: 1004-8.
- [63] Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 330: 517-22.
- [64] Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; 82: 1989-93.
- [65] Lindblad B, Svensson PJ, Dahlback B. Arterial and venous thromboembolism with fatal outcome and resistance to activated protein C. *Lancet* 1994; 343: 917.

- [66] 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 U S A* 1994; 91: 1396-400.
- [67] Dahlback B. New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1995; 74: 139-48.
- [68] Sun X, Evatt B, Griffin JH. Blood coagulation factor Va abnormality associated with resistance to activated protein C in venous thrombophilia. *Blood* 1994; 83: 3120-5.
- [69] Zoller B, Dahlback B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* 1994; 343: 1536-8.
- [70] Wang H, Riddell DC, Guinto ER, MacGillivray RT, Hamerton JL. Localization of the gene encoding human factor V to chromosome 1q21-25. *Genomics* 1988; 2: 324-8.
- [71] Jenny RJ, Pittman DD, Toole JJ *et al.* Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 4846-50.
- [72] Cripe LD, Moore KD, Kane WH. Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry* 1992; 31: 3777-85.
- [73] Nesheim ME, Katzmann JA, Tracy PB, Mann KG. Factor V. *Methods Enzymol* 1981; 80 Pt C: 249-74.
- [74] Jackson CM, Nemerson Y. Blood coagulation. *Annu Rev Biochem* 1980; 49: 765-811.
- [75] Miletich JP, Jackson CM, Majerus PW. Properties of the factor Xa binding site on human platelets. *J Biol Chem* 1978; 253: 6908-16.
- [76] Dahlback B, Stenflo J. Binding of bovine coagulation factor Xa to platelets. *Biochemistry* 1978; 17: 4938-45.

- [77] Tracy PB, Nesheim ME, Mann KG. Coordinate binding of factor Va and factor Xa to the unstimulated platelet. *J Biol Chem* 1981; 256: 743-51.
- [78] Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG. The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. *J Biol Chem* 1979; 254: 10952-62.
- [79] Tracy PB, Eide LL, Mann KG. Human prothrombinase complex assembly and function on isolated peripheral blood cell populations. *J Biol Chem* 1985; 260: 2119-24.
- [80] Nesheim ME, Kettner C, Shaw E, Mann KG. Cofactor dependence of factor Xa incorporation into the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 1981; 256: 6537-40.
- [81] Dahlbäck B. Resistance to activated protein C and venous thromboembolism. *J. Clin. Invest* 1994; 94: 923-927.
- [82] Mann KG, Jenny RJ, Krishnaswamy S. Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annu Rev Biochem* 1988; 57: 915-56.
- [83] Kane WH, Davie EW. Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 6800-4.
- [84] Suzuki K, Stenflo J, Dahlback B, Teodorsson B. Inactivation of human coagulation factor V by activated protein C. *J Biol Chem* 1983; 258: 1914-20.
- [85] Solymoss S, Tucker MM, Tracy PB. Kinetics of inactivation of membrane-bound factor Va by activated protein C. Protein S modulates factor Xa protection. *J Biol Chem* 1988; 263: 14884-90.
- [86] 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: 18735-8.
- [87] Jenny RJ, Tracy PM, Mann KG in: Haemostasis and Thrombosis, pp. 465-476 (Blood AL Forbes C, Thomas DP, Tuddenham EGD, Ed.) Churchill Livingstone, Edinburg, (1994).

- [88] Kalafatis M, Mann KG. Role of the membrane in the inactivation of factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* 1993; 268: 27246-57.
- [89] Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* 1994; 269: 31869-80.
- [90] Kalafatis M, Bertina RM, Rand MD, Mann KG. Characterization of the molecular defect in factor VR506Q. *J Biol Chem* 1995; 270: 4053-7.
- [91] Heeb MJ, Kojima Y, Greengard JS, Griffin JH. Activated protein C resistance: molecular mechanisms based on studies using purified Gln506-factor V. *Blood* 1995; 85: 3405-11.
- [92] Kalafatis M, Haley PE, Lu D, Bertina RM, Long GL, Mann KG. Proteolytic events that regulate factor V activity in whole plasma from normal and activated protein C (APC)-resistant individuals during clotting: an insight into the APC-resistance assay. *Blood* 1996; 87: 4695-707.
- [93] Rosing J, Hoekema L, Nicolaes GA *et al.* Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem* 1995; 270: 27852-8.
- [94] Zoller B, Holm J, Svensson P, Dahlback B. Elevated levels of prothrombin activation fragment 1 + 2 in plasma from patients with heterozygous Arg506 to Gln mutation in the factor V gene (APC-resistance) and/or inherited protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1996; 75: 270-4.
- [95] Martinelli I, Bottasso B, Duca F, Faioni E, Mannucci PM. Heightened thrombin generation in individuals with resistance to activated protein C. *Thromb Haemost* 1996; 75: 703-5.
- [96] Simioni P, Scarano L, Gavasso S *et al.* Prothrombin fragment 1+2 and thrombin-antithrombin complex levels in patients with inherited APC resistance due to factor V Leiden mutation. *Br J Haematol* 1996; 92: 435-41.
- [97] Varadi K, Rosing J, Tans G, Pabinger I, Keil B, Schwarz H. Factor V enhances the cofactor function of protein S in the APC-mediated

- inactivation of factor VIII: influence of the factor VR506Q mutation. *Thromb Haemost* 1996; 76: 208-214.
- [98] Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995; 270: 14477-84.
- [99] Zoller B, Garcia de Frutos P, Hillarp A, Dahlback B. Thrombophilia as a multigenic disease. *Haematologica* 1999; 84: 59-70.
- [100] Helley D, Besmond C, Bezeaud A, Elion J. Mutations and polymorphisms in exon 10 of the factor V gene in sickle cell patients. *British journal of haematology* 1996; 93: 3 (Abstract).
- [101] Rees DC. The population genetics of factor V Leiden (Arg506Gln). *Br J Haematol* 1996; 95: 579-86.
- [102] Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346: 1133-4.
- [103] Arruda VR, Annichino Bizzacchi JM, Costa FF, Reitsma PH. Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a Brazilian population. *Am J Hematol* 1995; 49: 242-3.
- [104] Schroder W, Koessling M, Wulff K, Wehnert M, Herrmann FH. World distribution of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1996; 347: 58-9.
- [105] Dzimiri N, Meyer B. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1996; 347: 481-2.
- [106] Akar N, Akar E, Dalgain G, Sözüöz A, Ömürlü K, Cin S. Frequency of factor V (1691 G A) mutation in Turkish population. *Thrombosis Haemostasis* 1997; 78: 1527-1529.
- [107] Rees D. The population genetics of factor V Leiden. *Br J Haematol* 1996; 95: 579-86.
- [108] Garcia Gala JM, Alvarez V, Pinto CR *et al.* Factor V Leiden (R506Q) and risk of venous thromboembolism: a case-control study based on the Spanish population. *Clin Genet* 1997; 52: 206-10.

- [109] Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study . *Lancet* 1993; 342: 1503-6.
- [110] Dahlback B. Molecular genetics of thrombophilia: factor V gene mutation causing resistance to activated protein C as a basis of the hypercoagulable state. *J Lab Clin Med* 1995; 125: 566-71.
- [111] Zoller B, Svensson PJ, He X, Dahlback B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest* 1994; 94: 2521-4.
- [112] Chan WP, Lee CK, Kwong YL, Lam CK, Liang R. A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood* 1998; 91: 1135-9.
- [113] Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306-->Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood* 1998; 91: 1140-4.
- [114] Zoller B, Berntsdotter A, Garcia de Frutos P, Dahlback B. Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood* 1995; 85: 3518-23.
- [115] Zoller B, He X, Dahlback B. Homozygous APC-resistance combined with inherited type I protein S deficiency in a young boy with severe thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1995; 73: 743-5.
- [116] Pabinger I, Schneider B. Thrombotic risk in hereditary antithrombin III, protein C, or protein S deficiency. A cooperative, retrospective study. Gesellschaft fur Thrombose- und Hamostaseforschung (GTH) Study Group on Natural Inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 742-8.
- [117] van Boven HH, Reitsma PH, Rosendaal FR *et al.* Factor V Leiden (FV R506Q) in families with inherited antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* 1996; 75: 417-21.

- [118] Beauchamp NJ, Daly ME, Cooper PC, Makris M, Preston FE, Peake IR. Molecular basis of protein S deficiency in three families also showing independent inheritance of factor V leiden. *Blood* 1996; 88: 1700-7.
- [119] Koeleman BP, Reitsma PH, Bertina RM. Familial thrombophilia: a complex genetic disorder. *Semin Hematol* 1997; 34: 256-64.
- [120] Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance) . *Blood* 1995; 85: 1504-8.
- [121] Mahasandana C, Suvatte V, Chuansumrit A *et al.* Homozygous protein S deficiency in an infant with purpura fulminans. *J Pediatr* 1990; 117: 750-3.
- [122] Dahlback B. Resistance to activated protein C caused by the factor VR506Q mutation is a common risk factor for venous thrombosis . *Thromb Haemost* 1997; 78: 483-8.
- [123] Ohlin AK, Marlar RA. The first mutation identified in the thrombomodulin gene in a 45-year-old man presenting with thromboembolic disease. *Blood* 1995; 85: 330-6.
- [124] Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-703.
- [125] Degen SJ, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry* 1987; 26: 6165-77.
- [126] Butkowski RJ, Elion J, Downing MR, Mann KG. Primary structure of human prethrombin 2 and alpha-thrombin. *J Biol Chem* 1977; 252: 4942-57.
- [127] Comp PC in: Life-span of plasma coagulation factors. Hematology, pp. 1290-1294 (Williams WJ BE, Erslev AJ, Lichtman MA, Ed.) McGraw-Hill Publishing Company, New York (1990).
- [128] Comp PC in: Production of plasma coagulation factors. Hematology, pp. 1285-1294 (Williams WJ, Bentler E, Erslev AJ,

- Lichtman MA, Ed.) Mc Graw-Hill Publishing Company, New York (1990) .
- [129] Nemerson Y, Williams WJ. (1990) in: Hematology, pp. 1267-1284 (Williams WJ BE, Erslev AJ, Lichtman MA, Ed.) McGraw-Hill Publishing Company, New York.
- [130] Jackson CM. The biochemistry of prothrombin activation. *Br J Haematol* 1978; 39: 1-8.
- [131] Furie B, Furie BC. in: The molecular basis of blood coagulation. Hematology: Basic principles and practice, pp. 1213-1231 (Hoffman MD, Benz EJ, Shatill SJ, Furie B, Cohen HJ, Ed.) Churchill Livingstone, New York (1991) .
- [132] Rosenberg JS, Beeler DL, Rosenberg RD. Activation of human prothrombin by highly purified human factors V and X-a in presence of human antithrombin. *J Biol Chem* 1975; 250: 1607-17.
- [133] Franco RF, Santos SE, Elion J, Tavella MH, Zago MA. Prevalence of the G20210A polymorphism in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene in different human populations. *Acta Haematol* 1998; 100: 9-12.
- [134] Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A *et al.* Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998; 79: 706-8.
- [135] Isshiki I, Murata M, Watanabe R *et al.* Frequencies of prothrombin 20210 G-->A mutation may be different among races--studies on Japanese populations with various forms of thrombotic disorders and healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9: 105-6.
- [136] Miyata T, Kawasaki T, Fujimura H, Uchida K, Tsushima M, Kato H. The prothrombin gene G20210A mutation is not found among Japanese patients with deep vein thrombosis and healthy individuals. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9: 451-2.
- [137] Cumming AM, Keeney S, Salden A, Bhavnani M, Shwe KH, Hay CR. The prothrombin gene G20210A variant: prevalence in a U.K. anticoagulant clinic population. *Br J Haematol* 1997; 98: 353-5.

- [138] Olafsson I, Hjaltadottir S, Onundarson PT, Porarinsdottir R, Haraldsdottir V. Prevalence of factor V(Q506) and prothrombin 20210 A mutations in an apparently healthy Icelandic population and patients suffering from venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1998; 79: 685-6.
- [139] Leroyer C, Mercier B, Oger E *et al.* Prevalence of 20210 A allele of the prothrombin gene in venous thromboembolism patients. *Thromb Haemost* 1998; 80: 49-51.
- [140] Brown K, Luddington R, Williamson D, Baker P, Baglin T. Risk of venous thromboembolism associated with a G to A transition at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene. *Br J Haematol* 1997; 98: 907-9.
- [141] Corral J, Gonzalez Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Heras I, Vicente V. The venous thrombosis risk factor 20210 A allele of the prothrombin gene is not a major risk factor for arterial thrombotic disease. *Br J Haematol* 1997; 99: 304-7.
- [142] Souto JC, Coll I, Llobet D *et al.* The prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thromb Haemost* 1998; 80: 366-9.
- [143] Vargas M, Soto I, Pinto CR *et al.* The prothrombin 20210A allele and the factor V Leiden are associated with venous thrombosis but not with early coronary artery disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999; 10: 39-41.
- [144] Hillarp A, Zoller B, Svensson PJ, Dahlback B. The 20210 A allele of the prothrombin gene is a common risk factor among Swedish outpatients with verified deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78: 990-2.
- [145] Kapur RK, Mills LA, Spitzer SG, Hultin MB. A prothrombin gene mutation is significantly associated with venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2875-9.
- [146] Ferraresi P, Marchetti G, Legnani C *et al.* The heterozygous 20210 G/A prothrombin genotype is associated with early venous thrombosis in inherited thrombophilias and is not increased in frequency in artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2418-22.

- [147] Balanzategui A, Alberca I, Lopez M *et al.* Variación G/A en la región no traducible 3' del gen de la protrombina: estudio 60 pacientes con enfermedad tromboembólica venosa (ETEV) y asociación con el FV Leiden. *Rev Iberoamer Tromb Hemostasia* 1997; 10: 138.
- [148] Howard TE, Marusa M, Channell C, Duncan A. A patient homozygous for a mutation in the prothrombin gene 3'-untranslated region associated with massive thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997; 8: 316-9.
- [149] Kyrle PA, Mannhalter C, Beguin S *et al.* Clinical studies and thrombin generation in patients homozygous or heterozygous for the G20210A mutation in the prothrombin gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1287-91.
- [150] Zawadzki C, Gaveriaux V, Trillot N *et al.* Homozygous G20210A transition in the prothrombin gene associated with severe venous thrombotic disease: two cases in a French family. *Thromb Haemost* 1998; 80: 1027-8.
- [151] Alatri A, Franchi F, Moia M. Homozygous G20210A prothrombin gene mutation without thromboembolic events: a case report. *Thromb Haemost* 1998; 80: 1028-9.
- [152] Egeber O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965; 13: 516-530.
- [153] Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-50.
- [154] Poort SR, Michiels JJ, Reitsma PH, Bertina RM. Homozygosity for a novel missense mutation in the prothrombin gene causing a severe bleeding disorder. *Thromb Haemost* 1994; 72: 819-24.
- [155] Rosen S, Johansson K, Lindberg K, Dahlback B. Multicenter evaluation of a kit for activated protein C resistance on various coagulation instruments using plasmas from healthy individuals. The APC Resistance Study Group. *Thromb Haemost* 1994; 72: 255-60.

- [156] Legnani C, Palareti G, Biagi R *et al.* Activated protein C resistance: a comparison between two clotting assays and their relationship to the presence of the factor V Leiden mutation . *Br J Haematol* 1996; 93: 694-9.
- [157] Aillaud MF, Succo E, Alessi MC *et al.* Resistance to activated protein C--diagnostic strategy in a laboratory of haemostasis. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1197-8.
- [158] Jorquera JI, Montoro JM, Fernandez MA, Aznar JA, Aznar J. Modified test for activated protein C resistance . *Lancet* 1994; 344: 1162-3.
- [159] Tosetto A, Rodeghiero F. Diagnosis of APC resistance in patients on oral anticoagulant therapy. *Thromb Haemost* 1995; 73: 732-3.
- [160] Cadroy Y, Sie P, Alhenc Gelas M, Aiach M. Evaluation of APC resistance in the plasma of patients with Q506 mutation of factor V (factor V Leiden) and treated by oral anticoagulants. *Thromb Haemost* 1995; 73: 734-5.
- [161] Nowak Gottl U, Kohlhase B, Vielhaber H, Aschka I, Schneppenheim R, Jurgens H. APC resistance in neonates and infants: adjustment of the APTT-based method. *Thromb Res* 1996; 81: 665-70.
- [162] Gouault Heilmann M, Leroy Matheron C. Evaluation of a new chromometric assay for factor V Leiden-dependent APC resistance. *Thromb Res* 1997; 85: 357-62.
- [163] Freyburger G, Javorschi S, Labrousse S, Bernard P. Proposal for objective evaluation of the performance of various functional APC-resistance tests in genotyped patients. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1360-5.
- [164] Souto JC, Fontcuberta J. Activated protein C resistance syndrome. *Sangre* 1997; 42: 453-66.
- [165] Soulier JP, Larrieu, MJ. Etude analytique des temps de Quick allongés. Dosages de prothrombine, de proconvertine et de proaccélérine. *Sangre* 1952; 23: 549-559.
- [166] Vissac AM, Grimaux M, Reber G, Bounomeaux H, Amiral J. A new

- sensitive membrane based ELISA technique for instantaneous D dimer evaluation in emergency. *Thromb Res* 1995; 78: 341-352.
- [167] Martínez-González MA, de Irala-Estevez J, Guillén-Grima F. ¿Qué es una odds ratio? *Medicina clínica* 1999; 112: 416-422.
- [168] Tanabe T. Japanese clinical statistical study of patients with deep venous thrombosis. *Nippon-Rinsho* 1992; 50: 368-372.
- [169] Wainscoat JS, Hill AVS, Boyce AL *et al.* Evolutionary relationships of human populations from an analysis of nuclear DNA polymorphisms. *Nature* 1986; 319: 491-493.
- [170] Stringer C. Secrets of the pit of bones. *Nature* 1993; 362: 501-502.
- [171] Ammerman AJ, Cavalli-Sforza LL. The neolithic transition and the genetics of populations in Europe. *Princeton University Press* 1984; : .
- [172] Richards M, Corte-Real H, Foster P *et al.* Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *American journal of human genetics* 1996; 59: 185-203.
- [173] Ozbek U, Tangu Y. Frequency of factor V Leiden (Arg506Gln) in Turkey. *Br J Haematol* 1997; 97: 504-5.
- [174] Holm J, Zoller B, Berntorp E, Erhardt L, Dahlback B. Prevalence of factor V gene mutation amongst myocardial infarction patients and healthy controls is higher in Sweden than in other countries. *J Intern Med* 1996; 239: 221-6.
- [175] Tordai A, Klein I, Rajczy K, Péntzes M, Sarkadi B, Váradi A. Prevalence of Factor V Leiden (Arg506Gln) in Hungary. *Br J of haematology* 1997; 99: 466-467.
- [176] Braun A, Muller B, Rosche AA. Population study of the G1691A mutation (R506Q, FV Leiden) in the human factor V gene that is associated with resistance to activated protein C. *Hum Genet* 1996; 97: 263-4.
- [177] Larsen TB, Lassen JF, Brandslund I, Byriel L, Petersen GB, Norgaard Pedersen B. The Arg506Gln mutation (FV Leiden) among a

- cohort of 4188 unselected Danish newborns. *Thromb Res* 1998; 89: 211-5.
- [178] Beauchamp NJ, Daly ME, Hampton KK, Cooper PC, Preston FE, Peake IR. High prevalence of a mutation in the factor V gene within the U.K. population: relationship to activated protein C resistance and familial thrombosis. *Br J Haematol* 1994; 88: 219-22.
- [179] Gisslinger H, Rintelen C, Mannhalter C *et al.* Factor V Leiden mutation is not a major cause of thrombotic tendency in essential thrombocythemia (ET) polycythemia vera (PV). *Blood* 1995; 86 (suppl.): 795a (Abstract).
- [180] Tosetto E, Gatto E, Rodeghiero F. APC resistance (FV Leiden) has a higher prevalence in females: preliminary results from the Vicenza Thrombophilia and Arteriosclerosis (VITA) project. *Thromb Haemost* 1995; 73: 1124.
- [181] Mannucci PM, Duca F, Peyvandi F *et al.* Frequency of Factor V Arg506Gln in Italians. *Thromb Haemost* 1996; 75: 694.
- [182] Maat MP, Kluft C, Jespersen J, Gram J. World distribution of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1996; 347: 58.
- [183] Kontula K, Yikorkala A, Miettinen H *et al.* Arg506Gln factor V mutation in patients with ischaemic cerebrovascular disease and survivors of myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1995; 73: 558-560.
- [184] Lucotte G, Mercier G. Frequency of Factor V Leiden (Arg506Gln) in France. *British Journal of Haematology* 1997; 99: 237-241.
- [185] Zabalegui N, Montes R, Orbe J *et al.* Prevalence of FVR506Q and prothrombin 20210A mutations in the Navarrese population. *Thromb Haemost* 1998; 80: 522-3.
- [186] de Water NV, Williams R, Dare A, Abbott W, Browett P. The prevalence of Factor V Leiden (Gln506) in Polynesians. *Thromb Haemost* 1997; 78: 962-963.
- [187] Ishida F, Ito T, Ichicawa N *et al.* Arg506Gln factor V mutation is uncommon in Eastern Asian populations. *Blood* 1995; 86: 917a.

- [188] Gou D, Naipal A, Reitsma PH. World distribution of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1996; 347: 59.
- [189] Takamiya O, Ishida F, Kodaira H, Kitano K. APC-resistance and Mnl I genotype (Gln 506) of coagulation factor V are rare in Japanese population. *Thromb Haemost* 1995; 74: 996.
- [190] Arnutti P, Hiyoshi M, Prayoonwiwat W *et al.* Coagulation factor V Leiden mutation was detected in the patients with activated protein C resistance in Thailand. *Thromb Haemost* 1998; 80: 344-5.
- [191] Helley D, Besmond C, Ducrocq R *et al.* Polymorphism in exon 10 of the human coagulation factor V gene in a population at risk for sickle cell disease. *Hum Genet* 1997; 100: 245-8.
- [192] Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. 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: 912-7.
- [193] Dilley A, Austin H, Cupertino M, Hooper C, Wenger N, Evatt B. Risk factors for deep vein thrombosis in the African-American population. *Blood* 1995; 86: 87a.
- [194] Pottinger P, Sigurdsson F, Berliner N. Detection of Factor V Leiden in a nonselected black population. *Blood* 1996; 87: 2091.
- [195] Gregg JP, Yamane AJ, Grody WW. Prevalence of the factor V-Leiden mutation in four distinct American ethnic populations. *Am J Med Genet* 1997; 73: 334-6.
- [196] Kohler HP, Boothby M, McCormack L, Knowler WC, Grant PJ. Incidence of Arg506Gln mutation (Factor V Leiden) in Pima Indians. *Thromb Haemost* 1997; 78: 961-962.
- [197] Camacho-Vanegas O, Giusti B, Restrepo Fernandez CM, Abbate R, Pepe G. Frequency of factor V (FV) Leiden and C677T methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in Colombians. *Thromb Haemost* 1998; 79: 883-4.

- [198] Arruda VR, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, Annichino Bizzacchi JM, Costa FF. Very low incidence of Arg506-->Gln mutation in the factor V gene among the Amazonian Indians and the Brazilian black population. *Thromb Haemost* 1996; 75: 860-1.
- [199] Bockxmeer FM, Baker RI, Taylor RR. Premature ischaemic heart disease and the gene for coagulation factor V. *Nature Medicine* 1995; 1: 185.
- [200] Cox MJ, Rees DC, Martinson JJ, Clegg JB. Evidence for a single origin of factor V Leiden. *Br J Haematol* 1996; 92: 1022-5.
- [201] Zivelin A, Griffin JH, Xu X *et al.* A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood* 1997; 89: 397-402.
- [202] Zoller B, Hillarp A, Dahlback B. Activated protein C resistance caused by a common factor V mutation has a single origin. *Thromb Res* 1997; 85: 237-43.
- [203] Rees DC, Clarke K, Martin PG, Keeling DM. Factor V Leiden haplotypes in two homozygotes of Asian origin. *Br J Haematol* 1998; 102: 1381-2.
- [204] Lucotte G, Hazout S. Y-chromosome DNA haplotypes in Basques. *Journal of Molecular Evolution* 1996; 42: 4672-4675.
- [205] Ehrenforth S, Ludwig G, Klinke S, Krause M, Scharrer I, Nowak Gottl U. The prothrombin 20210 A allele is frequently coinherited in young carriers of the factor V Arg 506 to Gln mutation with venous thrombophilia. *Blood* 1998; 91: 2209-10.
- [206] Svensson PJ, Benoni G, Fredin H *et al.* Female gender and resistance to activated protein C (FV:Q506) as potential risk factors for thrombosis after elective hip arthroplasty. *Thromb Haemost* 1997; 78: 993-6.
- [207] Turkstra F, Karemaker R, Kuijter PM, Prins MH, Büller HR. Is the prevalence of the Factor V Leiden mutation in patients with pulmonary embolism and deep vein thrombosis really different? *Thromb Haemost* 1999; 81: 345-348.

- [208] Van't Veer C, Kalafatis M, Bertina RM, Simioni P, Mann KG. Increased tissue factor-initiates prothrombin activation as a result of the Arg506Gln mutation in factor V Leiden. *J Biol Chem* 1997; 272: 20721-20729.
- [209] Manten B, Westendorp RG, Koster T, Reitsma PH, Rosendaal FR. Risk factor profiles in patients with different clinical manifestations of venous thromboembolism: a focus on the factor V Leiden mutation . *Thromb Haemost* 1996; 76: 510-3.
- [210] Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V *et al.* Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood* 1998; 92: 2353-8.
- [211] Baglin TP, Brown K, Williamson D, Baker P, Luddington R. Relative risk of pulmonary embolism and deep vein thrombosis in association with the factor V Leiden mutation in a United Kingdom population. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1219.
- [212] Bajzar L, Kalafatis M, Simioni P, Tracy PB. An antifibrinolytic mechanism describing the prothrombotic effect associated with factor VLeiden. *J Biol Chem* 1996; 271: 22949-52.
- [213] Martinelli I, Cattaneo M, Panzeri D, Mannucci PM. Low prevalence of factor V:Q506 in 41 patients with isolated pulmonary embolism. *Thromb Haemost* 1997; 77: 440-3.
- [214] Dahlback B. Resistance to activate protein C, the Arg506 to Gln mutation in the factor V gene, and venous thrombosis. Functional tests and DNA-based assays, pros and cons . *Thromb Haemost* 1995; 73: 739-42.
- [215] Middeldorp S, van der Meer J. Factor V:Q506 mutation-resistance to activated protein C (APC): clinical implications with respect to family screening. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24: 363-6.
- [216] Simioni P, Prandoni P, Girolami A. Low rate of venous thromboembolism in asymptomatic relatives of probands with Factor V Leiden mutation. *Annals of Internal Medicine* 1999; 130: 538.

- [217] Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Aillaud MF *et al.* Clinical features in 36 patients homozygous for the 506Gln Factor V mutation. *Thromb Haemost* 1997; 77: 620-623.
- [218] Samama M, Trossaert M, Horellou MH, Elalamy I, Conard J, Deschamps A. Risk of thrombosis in patients homozygous for Factor V Leiden. *Blood* 1995; 86: 4700-4701.
- [219] Vandenbroucke JP, Bertina RM, Holmes ZR *et al.* Factor V Leiden and fatal pulmonary embolism. *Thromb Haemost* 1998; 79: 511-6.
- [220] Dunn ST, Trong S. Evaluation of role of factor V Leiden mutation in fatal pulmonary thromboembolism. *Thromb Res* 1998; 91: 7-14.
- [221] Mannucci PM, Duca F, Merati G, Peyvandi F, Tagliabue L, Mari D. Mutant Factor V (Arg506Gln) in healthy centenarians. *Lancet* 1996; 347: 1044.
- [222] Faure Delanef L, Quere I, Zouali H, Cohen D. Human longevity and R506Q factor V gene mutation. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1160.
- [223] Heijmans BT, Westendorp RGJ, Knook DL, Kluft C, Slagboom PE. The risk of mortality and the Factor V Leiden mutation in a population based-cohort. *Thromb Haemost* 1998; 80: 607-609.
- [224] Kristensen SR, Andersen-Ranberg K, Bathum L, Jeune B. Factor V Leiden and venous thrombosis in danish centenarians. *Thromb Haemost* 1998; 80: 860-861.
- [225] Lindqvist PG, Svensson PJ, Dahlback B, Marsal K. Factor V Q506 mutation (activated protein C resistance) associated with reduced intrapartum blood loss--a possible evolutionary selection mechanism. *Thromb Haemost* 1998; 79: 69-73.
- [226] Lindahl T, Lindahl T, Nilsson L, Andersson C. APC resistance is a risk factor for postoperative thromboembolism in elective replacement of the hip or knee. A prospective study. *Thromb Haemost* 1999; 81: 18-21.
- [227] Ryan DH, Crowther MA, Ginsberg JS, Francis CW. Relation of factor V Leiden genotype to risk for acute deep venous thrombosis after joint replacement surgery. *Ann Intern Med* 1998; 128: 270-6.

- [228] Donnell J, Tuddenham EG, Manning R, Kemball Cook G, Johnson D, Laffan M. High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia screening: role of increased synthesis and relationship to the acute phase reaction. *Thromb Haemost* 1997; 77: 825-8.
- [229] Bastounis E, Karayiannakis A, Makri G, Alexiou D, Papalambros L. The incidence of occult cancer in patients with deep venous thrombosis. A prospective study. *J Intern Med* 1996; 239: 153-156.
- [230] McKenna M. Deep venous thrombosis and the risk of cancer. *Arch Intern Med* 1989; 149: 968-969.
- [231] Gordon S, Mielicki W. Cancer procoagulant: A factor X activator, tumor marked and growth factor from malignant tissue. *Blood Coag Fibrinolysis* 1997; 8: 73-86.
- [232] Sifontes MT, Nuss R, Hunger SP, Wilimas J, Jacobson LJ, Manco Johnson MJ. The factor V Leiden mutation in children with cancer and thrombosis. *Br J Haematol* 1997; 96: 484-9.
- [233] Friederich P, Sanson B, Simioni P. Frequency of pregnancy-related venous thromboembolism in anticoagulant factor-deficient women: implications for prophylaxis. *Ann Intern Med* 1996; 125: 955-960.
- [234] De Stefano V, Mastrangelo S, Paciaroni K. Thrombotic risk during pregnancy and puerperium in women with APC-resistance-effective subcutaneous heparin prophylaxis in a pregnant patient. *Thromb Haemost* 1995; 74: 793-794.
- [235] Lindqvist PG, Svensson PJ, Marsaal K, Grennert L, Luterkort M, Dahlback B. Activated protein C resistance (FV:Q506) and pregnancy. *Thromb Haemost* 1999; 81: 532-7.
- [236] Murphy R, Donoghue C, Nallen R *et al.* Prospective evaluation of the risk conferred by Factor V Leiden and Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase polymorphisms in pregnancy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 266-270.
- [237] Hellgren M, Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thromboembolism associated with

- pregnancy and oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 210-3.
- [238] Hallak M, Senderowicz J, Cassel A *et al.* Activated protein C resistance (factor V Leiden) associated with thrombosis in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 889-93.
- [239] Bokarewa MI, Bremme K, Blomback M. Arg506-Gln mutation in factor V and risk of thrombosis during pregnancy. *Br J Haematol* 1996; 92: 473-8.
- [240] Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID *et al.* Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 1996; 348: 913-6.
- [241] Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D *et al.* Factor V Leiden is associated with repeated and recurrent unexplained fetal losses. *Thromb Haemost* 1997; 77: 822-4.
- [242] Meinardi J, Middeldorp M, De Kam P, Koopman M, *al. e.* Increased risk for fetal loss in carriers of the Factor V Leiden mutation. *Ann Intern Med* 1999; 130: 736-739.
- [243] Ridker PM, Miletich JP, Buring JE *et al.* Factor V Leiden mutation as a risk factor for recurrent pregnancy loss. *Ann Intern Med* 1998; 128: 1000-3.
- [244] Organization WH. Collaborative study of cardiovascular disease and steroid hormone contraception. Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: results of international multicentre case-control study. *Lancet* 1995; 346: 1582-1588.
- [245] Organization WH. Collaborative study of cardiovascular disease and steroid hormone contraception. Effect of different progestagens in low oestrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease. *Lancet* 346: 1582-1588.
- [246] Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994; 344: 1453-7.

- [247] Olivieri O, Friso S, Manzato F *et al.* Resistance to activated protein C, associated with oral contraceptives use; effect of formulations, duration of assumption, and doses of oestro-progestins. *Contraception* 1996; 54: 149-52.
- [248] Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Buller HR, Vandenbroucke JP. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet* 1995; 346: 1593-6.
- [249] Rintelen C, Mannhalter C, Ireland H *et al.* Oral contraceptives enhance the risk of clinical manifestation of venous thrombosis at a young age in females homozygous for factor V Leiden. *Br J Haematol* 1996; 93: 487-90.
- [250] Boerger LM, Morris PC, Thurnau GR, Esmon CT, Comp PC. Oral contraceptives and gender affect protein S status. *Blood* 1987; 69: 692-4.
- [251] Henkens CM, Bom VJ, Seinen A, van der Meer J. Sensitivity to activated protein C; influence of oral contraceptives and sex. *Thromb Haemost* 1995; 73: 402-404.
- [252] Gilabert J, Estelles A, Cano A *et al.* The effect of estrogen replacement therapy with or without progestogen on the fibrinolytic system and coagulation inhibitors in postmenopausal status. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1849-54.
- [253] Malm J, Laurell M, Dahlback B. Changes in the plasma levels of vitamin K-dependent proteins C and S and of C4b-binding protein during pregnancy and oral contraception. *Br J Haematol* 1988; 68: 437-43.
- [254] Rosing J, Tans G, Nicolaes G, *al. e.* Oral contraceptives and venous thrombosis: different sensitivities to activated protein C in women using second-and third generation oral contraceptives. *Br J Haematol* 1997; 97: 233-238.
- [255] Schambeck C, Schwender S, Haubitz I, Geisen U, Grossmann R, Keller F. Selective screening for the Factor V Leiden mutation: is it advisable prior to the prescription of oral contraceptives? *Thromb Haemost* 1997; 78: 1480-1483.

- [256] Rosendaal FR. Oral contraceptives and screening for factor V Leiden. *Thromb Haemost* 1996; 75: 524-5.
- [257] Vandenbroucke JP, van der Meer FJ, Helmerhorst FM, Rosendaal FR. Factor V Leiden: should we screen oral contraceptive users and pregnant women? . *BMJ* 1996; 313: 1127-30.
- [258] Altes A, Souto JC, Mateo J, Borrell M, Fontcuberta J. Activated protein C resistance assay when applied in the general population. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 358-9.
- [259] Forastiero RR, Kordich L, Basilotta E, Carreras LO. Differences in protein S and C4b-binding protein levels in different groups of patients with antiphospholipid antibodies. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5: 609-16.
- [260] Nicolaidis A, Bergqvist D, Hull R. Prevention of venous thromboembolism. *Int Angiol* 1997; 163: 38.
- [261] de Groot PG, Derksen RH. Protein C pathway, antiphospholipid antibodies and thrombosis. *Lupus* 1994; 3: 229-233.
- [262] Bokarewa M, Blombäck M, Egberg N, Rosén S. A new variation of interaction between phospholipid antibodies and the PC system. *Blood Coag Fibrinolysis* 1994; 5: 37-41.
- [263] Matsuda J, Gotoh M, Gohchi K, Kawasugi K, Tsukamoto M, Saitoh N. Resistance to activated protein C activity of an anti-beta 2-glycoprotein I antibody in the presence of beta 2-glycoprotein I. *Br J Haematol* 1995; 90: 204-6.
- [264] Robert A, Eschwege V, Hameg H, Drouet L, Aillaud MF. Anticoagulant response to Agkistrodon contortrix venom (ACV test): a new global test to screen for defects in the anticoagulant protein C pathway. *Thromb Haemost* 1996; 75: 562-6.
- [265] Dati F, Hafner G, Erbes H *et al.* ProC Global: the first functional screening assay for the complete protein C pathway. *Clin Chem* 1997; 43: 1719-23.

- [266] Bokarewa MI, Blomback M, Bremme K. Phospholipid antibodies and resistance to activated protein C in women with thrombophilia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6: 417-22.
- [267] Bokarewa MI, Bremme K, Falk G, Sten Linder M, Egberg N, Blomback M. Studies on phospholipid antibodies, APC-resistance and associated mutation in the coagulation factor V gene. *Thromb Res* 1995; 78: 193-200.
- [268] Dizon Townson D, Hutchison C, Silver R, Branch DW, Ward K. The factor V Leiden mutation which predisposes to thrombosis is not common in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1029-31.
- [269] Kraus M. The anticoagulant potential of the protein C system in hereditary and acquired thrombophilia: pathomechanisms and new tools for assessing its clinical relevance. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24: 337-54.
- [270] Grandille S, Greengard J, Alhenc-Gelas M, cols. y. 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.
- [271] Hallam PJ, Millar DS, Krawczak M, Kakkar VV, Cooper DN. Population differences in the frequency of the factor V Leiden variant among people with clinically symptomatic protein C deficiency. *J Med Genet* 1995; 32: 543-5.
- [272] Pabinger I, Mustafa S, Rintelen C, Kyrle P, Lechner K, Mannhalter C. Factor V Leiden mutation (APC-resistance) increases the risk for venous thromboembolism in patients with a gene defect of the protein c (PC) or protein S (PS) gene. *Thromb Haemost* 1995; 73: 1361.
- [273] Halbmayr WM, Haushofer A, Schon R, Fischer M. The prevalence of poor anticoagulant response to activated protein C (APC resistance) among patients suffering from stroke or venous thrombosis and among healthy subjects . *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5: 51-7.
- [274] Faioni E, Franchi F, Asti D, Sacchi E, Bernardi F, Mannucci P. Resistance to activated protein C in nine thrombophilic families:

- interference in a protein S functional assay. *Thromb Haemost* 1993; 70: 1067-1070.
- [275] Faioni EM, Boyer Neumann C, Franchi F, Wolf M, Meyer D, Mannucci PM. Another protein S functional assay is sensitive to resistance to activated protein C. *Thromb Haemost* 1994; 72: 648.
- [276] Cooper PC, Hampton KK, Makris M, Abuzenadah A, Paul B, Preston FE. Further evidence that activated protein C resistance can be misdiagnosed as inherited functional protein S deficiency. *Br J Haematol* 1994; 88: 201-3.
- [277] Simioni P, Gavasso S, Luni S, Invidiato S, Girolami A. A protein S functional assay yields unsatisfactory results in patients with activated protein C resistance. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6: 286-7.
- [278] Ireland H, Bayston T, Chowdhury V *et al.* Factor V leiden as an independent risk factor for thrombosis in antithrombin deficiency type II: heparin binding site. *Thromb Haemost* 1995; 73: 1361.
- [279] Radtke K, Lane D, Greengard J, Ehrenforth S, Griffin J, Scharrer I. Combined hereditary APC resistance and AT III type II deficiency associated with venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1995; 73: 1377.
- [280] Shen L, He X, Dahlback B. Synergistic cofactor function of factor V and protein S to activated protein C in the inactivation of the factor VIIIa - factor IXa complex -- species specific interactions of components of the protein C anticoagulant system. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1030-6.
- [281] Inbal A, Kenet G, Zivelin A *et al.* Purpura fulminans induced by disseminated intravascular coagulation following infection in 2 unrelated children with double heterozygosity for factor V Leiden and protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1086-9.
- [282] Van Boven H, Vanderbroucke J, Briët E, Rosendaal F. Gene-gene and gene-environment interactions determine risk of thrombosis in families with inherited antithrombin deficiency. *Blood* 1999; 94: 2590-2594.
- [283] Bertina R, Gusch J. The molecular basis of activated protein C resistance. *Rev Iberoamer Thromb Hemost* 1996; 9: 4-6.

- [284] de Visser MC, Rosendaal FR, Bertina RM. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. *Blood* 1999; 93: 1271-6.
- [285] Faioni E, Franchi F, Asti D, Mannucci P. Acquired resistance to activated protein C develops during pregnancy. *Thromb Haemost* 1995; 73: 1375.
- [286] Bokarewa M, Blombäck K, Bremme K. Changes in the response to activated protein C during pregnancy. *Thromb Haemost* 1995; 73: 1377.
- [287] Cumming AM, Tait RC, Fildes S, Yoong A, Keeney S, Hay CR. Development of resistance to activated protein C during pregnancy. *Br J Haematol* 1995; 90: 725-7.
- [288] Clark P, Brennand J, Conkie J, McColl F, Greer I, Walker I. Activated protein C resistance (APCR) in pregnancy and the puerperium. *Haemostasis* 1996; 26: 467a.
- [289] Simioni P, Girolami A. Homozygous factor V-deficient patients show resistance to activated protein C whereas heterozygotes do not. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5: 825-7.
- [290] Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E *et al.* A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood* 1997; 90: 1552-7.
- [291] Lunghi B, Iacoviello L, Gemmati D *et al.* Detection of new polymorphic markers in the factor V gene: association with factor V levels in plasma. *Thromb Haemost* 1996; 75: 45-8.
- [292] Chafa O, Reghis A, Aubert A, Fischer AM. Prevalence of the FVQ506 (Factor V Leiden) mutation in the normal and thrombophilic algerian population. *British Journal of Haematology* 1997; 97: 688-689.
- [293] Ridker PM, Miletich JP, Stampfer MJ, Goldhaber SZ, Lindpaintner K, Hennekens CH. Factor V Leiden and risks of recurrent idiopathic venous thromboembolism. *Circulation* 1995; 92: 2800-2.
- [294] Simioni P, Prandoni P, Lensing AW *et al.* The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with an Arg506-->Gln mutation in

- the gene for factor V (factor V Leiden). *N Engl J Med* 1997; 336: 399-403.
- [295] Eichinger S, Pabinger I, Stumpflen A *et al.* The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with and without factor V Leiden. *Thromb Haemost* 1997; 77: 624-8.
- [296] De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM *et al.* The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med* 1999; 341: 801-6.
- [297] Lindmarker P, Schulman S, Sten Linder M, Wiman B, Egberg N, Johnsson H. The risk of recurrent venous thromboembolism in carriers and non-carriers of the G1691A allele in the coagulation factor V gene and the G20210A allele in the prothrombin gene. DURAC Trial Study Group. Duration of Anticoagulation. *Thromb Haemost* 1999; 81: 684-9.
- [298] Baglin C, Brown K, Luddington R, Baglin T. Risk of recurrent venous thromboembolism in patients with the factor V Leiden (FVR506Q) mutation: effect of warfarin and prediction by precipitating factors. *British Journal of Haematology* 1998; 100: 764-768.
- [299] Grau E, Real E, Medrano J, Pastor E, Selfa S. Recurrent venous thromboembolism in a spanish population: incidence, risk factors and management in a hospital setting. *Thrombosis Research* 1999; 96: 335-341.
- [300] Antoniadis T, Hatzis T, Kroupis C, Economou-Petersen E, Petersen MB. Prevalence of factor V Leiden, prothrombin G20210A and MTHFR C677T mutations in a greek population of blood donors. *Am J Hematol* 1999; 61: 265-267.
- [301] Helley D, Chafa O, Yaker NL, Reghis A, Fischer AM. Prevalence of the prothrombin gene 20210A mutation in thrombophilic and healthy algerian subjects. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1554-1555.
- [302] Balogh I, Póka R, Losonczy G, Muszbek L. High frequency of Factor V Leiden mutation and Prothrombin 20210A variant in Romanies of Eastern Hungary. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1555-1556.

- [303] Ehrenforth S, von Depka Prondsinski M, Aygoren Pursun E, Nowak Gottl U, Scharrer I, Ganser A. Study of the prothrombin gene 20201 GA variant in FV:Q506 carriers in relationship to the presence or absence of juvenile venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 276-80.
- [304] Tosetto A, Missiaglia E, Frezzato M, Rodeghiero F. The VITA Project: Prothrombin G20210A mutation and venous thromboembolism in the general population. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1395-1398.
- [305] Cattaneo M, Chantarangkul V, Taioli E, Santos JH, Tagliabue L. The G20210A mutation of the prothrombin gene in patients with previous first episodes of deep-vein thrombosis: prevalence and association with factor V G1691A, methylenetetrahydrofolate reductase C677T and plasma prothrombin levels. *Thromb Res* 1999; 93: 1-8.
- [306] Maat MP, Bladbjerg EM, Johansen LG, Gram J, Jespersen J. Absence of prothrombin mutation in Inuit (Greenland Eskimos). *Thromb Haemost* 1998; 79: 882.
- [307] Hainaut P, Gala JL, Lesage V *et al.* The prothrombin gene G20210A variant in an unselected thromboembolic population. A belgian prospective clinical study. *Acta Clin Belg* 1998; 53: 344-348.
- [308] Lin JS, Shen MC, Tsay W. The mutation at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is extremely rare in Taiwanese Chinese patients with venous thrombophilia. *Thromb Haemost* 1998; 80: 343.
- [309] Arruda VR, Annichino, -Bizzacchi, J.M., Gonçalves MS, Costa FF. Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1430-1433.
- [310] Franco RF, Trip MD, ten Cate H *et al.* The 20210 G-->A mutation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease. *Br J Haematol* 1999; 104: 50-4.
- [311] Zivelin A, Rosenberg N, Faier S *et al.* A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Blood* 1998; 92: 1119-24.

- [312] Dilley A, Austin H, Hooper WC *et al.* Prevalence of the prothrombin 20210 G-to-A variant in blacks: infants, patients with venous thrombosis, patients with myocardial infarction, and control subjects. *J Lab Clin Med* 1998; 132: 452-5.
- [313] Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation* 1999; 99: 999-1004.
- [314] Girolami A, Simioni P, Tormene D, Scarano L. Two additional homozygous patients for the 20210 prothrombin polymorphism with no venous thrombosis. *Thrombosis Research* 1999; 96: 415-417.
- [315] Zuazu-Jausoro I, Sanchez I, Fernandez MC, Corral J, Gonzalez Conejero R, Vicente V. Portal and mesenteric venous thrombosis in a patient heterozygous for the 20210 A allele of the prothrombin gene. *Haematologica* 1998; 83: 1129-30.
- [316] Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N *et al.* Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340: 9-13.
- [317] Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D *et al.* Genetic susceptibility to pregnancy-related venous thromboembolism: roles of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1324-8.
- [318] Martinelli I, Taioli E, Bucciarelli P, Akhavan S, Mannucci PM. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 700-3.
- [319] Bentolila S, Ripoll L, Drouet L, Crassard E, Tornier-Lasserve J, Piette C. Lack of association between thrombosis in primary antiphospholipid syndrome and the recently described thrombophilic 3'-untranslated prothrombin gene polymorphism. *Thrombosis and Haemostasis* 1997; 78: 1415-1421.
- [320] Bertolaccini ML, Atsumi T, Hunt BJ, Amengual O, Khamashta MA, Hughes GR. Prothrombin mutation is not associated with thrombosis in

- patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1998; 80: 202-3.
- [321] De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K *et al.* Prevalence of the factor II G20210A mutation in symptomatic patients with inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* 1998; 80: 342-3.
- [322] Makris M, Preston FE, Beauchamp NJ *et al.* Co-inheritance of the 20210A allele of the prothrombin gene increases the risk of thrombosis in subjects with familial thrombophilia. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1426-1429.
- [323] Bovill E, Hasstedt S, Callas P *et al.* The G20210A prothrombin polymorphism is not associated with increased thromboembolic risk in a large protein c deficient kindred. *Thromb Haemost* 2000; 83: 366-370.
- [324] Bertina R. Protein C deficiency and venous thrombosis-the search for the second genetic defect. *Thrombosis and Haemostasis* 2000; 83: 360-361.
- [325] Smirnov M, Safa O, Esmon N, Esmon C. Inhibition of activated protein C anticoagulant activity by prothrombin. *Blood* 1999; 94: 3839-3846.
- [326] Rosendaal FR, Vos HL, Poort SL, Bertina RM. Prothrombin 20210A variant and age at thrombosis. *Thromb Haemost* 1998; 79: 444.
- [327] Eichinger S, Minar E, Hirschl M *et al.* The risk of early recurrent venous thromboembolism after oral anticoagulant therapy in patients with the G20210A transition in the prothrombin gene. *Thromb Haemost* 1999; 81: 14-17.
- [328] Veyradier A, Wolf M, Boyer Neumann C, Parent F, Simonneau G, Meyer D. Recurrent thromboembolism in two unrelated patients with double heterozygosity for factor V R506Q and factor II 20210G/A mutations. *Thromb Haemost* 1998; 80: 201-2.
- [329] Alhenc-Gelas M, Le Cam Ducheux V, Emmerich J *et al.* The A20210 allele of the prothrombin gene is not frequently associated with the factor V Arg 506 to Gln mutation in thrombophilic families. *Blood* 1997; 90: 1711.

- [330] Zoller B, Svensson PJ, Dahlback B, Hillarp A. The A20210 allele of the prothrombin gene is frequently associated with the factor V Arg 506 to Gln mutation but not with protein S deficiency in thrombophilic families. *Blood* 1998; 91: 2210-1.
- [331] Prisco D, Gori AM, Pepe G *et al.* Factor II 20210 G-->A polymorphism associated to factor V Leiden: a report of two thrombophilic families. *Thromb Res* 1998; 89: 249-52.
- [332] Howard TE, Marusa M, Boisza J *et al.* The prothrombin gene 3'-untranslated region mutation is frequently associated with factor V Leiden in thrombophilic patients and shows ethnic-specific variation in allele frequency. *Blood* 1998; 91: 1092.
- [333] van der Meer FJ, Koster T, Vandenbroucke JP, Briet E, Rosendaal FR. The Leiden Thrombophilia Study (LETS). *Thromb Haemost* 1997; 78: 631-5.
- [334] Margaglione M, D'Andrea G, Giuliani N *et al.* Inherited prothrombotic conditions and premature ischemic stroke: sex difference in the association with factor V Leiden. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1751-6.
- [335] Lensing AWA, Prins MH. Recurrent deep vein thrombosis and two coagulation factor gene mutations: Quo vadis? *Thromb Haemost* 1999; 82: 1564-1566.
- [336] Bloem BR, van Putten MJ, van der Meer FJ, van Hilten JJ, Bertina RM. Superior sagittal sinus thrombosis in a patient heterozygous for the novel 20210 A allele of the prothrombin gene. *Thromb Haemost* 1998; 79: 235.
- [337] Simioni P, Tormene D, Manfrin D *et al.* Prothrombin antigen levels in symptomatic and asymptomatic carriers of the 20210A prothrombin variant. *Br J Haematol* 1998; 103: 1045-50.
- [338] Seligson U, Zivelin A. Thrombophilia as a multigenic disorder. *Thromb Haemost* 1997; 78: 297-301.