

Asociación de la RPCA con mutaciones Leiden y Cambridge del factor V de la coagulación en pacientes mexicanos con trombofilia primaria

César Zavala-Hernández,* Edgar Hernández-Zamora,** Carlos Martínez-Murillo,*** María de la Luz Arenas-Sordo,** Ana Elena González-Orozco,& Elba Reyes-Maldonado&

Resumen

Introducción: Las mutaciones Leiden y Cambridge del factor V de la coagulación y la resistencia a la proteína C activada (RPCA) son alteraciones que se relacionan con trombosis venosa y arterial. En este trabajo se analizó si la RPCA está asociada con las mutaciones Leiden y Cambridge, y la frecuencia de éstas en población mestiza mexicana.

Material y métodos: Se incluyeron 150 pacientes mexicanos con trombofilia primaria y 100 sujetos sanos. Se determinó la RPCA empleando método comercial y los genotipos factor V Leiden y factor V Cambridge mediante PCR-RFLPs.

Resultados: La RPCA fue positiva en cuatro pacientes y en un individuo control; sin embargo, no se encontró la mutación Leiden o Cambridge en la población estudiada, por lo que la RPCA no se correlacionó con ninguna de las mutaciones investigadas.

Conclusiones: Los resultados indican que existen otras causas primarias o secundarias diferentes a las analizadas, que condicionan la RPCA. Además, la frecuencia obtenida para la RPCA en nuestra población trombofílica mestiza mexicana fue menor comparada con la obtenida en población caucásica, quizá por tratarse de poblaciones genéticamente diferentes.

Palabras clave: Factor V Cambridge, factor V Leiden, trombofilia.

Summary

Background: Leiden and Cambridge factor V coagulation mutations and activated protein C resistance (APCR) are alterations related with vein and artery thrombosis. In this study we aimed to determine whether APCR is associated with the presence of Leiden and Cambridge mutation and the frequency of these mutations in the racially mestizo Mexican population.

Methods: We included 150 Mexican patients with primary thrombophilia and 100 healthy subjects in this study. APCR was determined using commercial methods and genotypes FV Leiden and FV Cambridge with PCR-RFLPs.

Results: APCR was positive in four patients and in one control individual; however, there was no presence of Leiden or Cambridge mutation in the studied group; thus, APCR was not correlated with the presence of any of the studied mutations.

Conclusions: These results indicate that there are other primary or secondary causes different from those studied, which condition the presence of APCR. Furthermore, the frequency obtained for APCR in our thrombophilic population of racially mixed Mexicans is lower compared to that obtained in the Caucasian population, most probably because they are genetically different populations.

Key words: Factor V Cambridge, factor V Leiden, thrombophilia.

* Laboratorio Central de Patología Clínica, Instituto Nacional de Rehabilitación, México, D. F.

** Servicio de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación, México, D. F.

*** Clínica de Hemostasia y Trombosis, Hospital General de México, México, D. F.

& Laboratorio de Citología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D. F.

Solicitud de sobretiros:

Edgar Hernández-Zamora. Servicio de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación, Av. México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, Del. Tlalpan, 14389 México D. F. Fax: (55) 5645 5603. E-mail: edgarhz1969@yahoo.com.mx

Recibido para publicación: 23-07-2009

Aceptado para publicación: 03-12-2009

Introducción

La proteína C es una glucoproteína dependiente de la vitamina K, que se sintetiza en el hígado y es clave en la vía de la anticoagulación natural, que regula la actividad procoagulante del factor Va y VIIIa (a: activado). La proteína C se activa cuando la trombina se une a la trombomodulina en la pared endotelial. La proteína C activada (PCa) junto con su cofactor, la proteína S libre, degrada proteolíticamente los factores Va y VIIIa, controlando de esta manera la potente acción procoagulante de estos factores.¹⁻⁴

El factor V tiene la capacidad dual de participar como cofactor procoagulante (cuando se activa) o anticoagulante

(cuando no está activado y se une a la PCa).⁵ El gen que codifica para el factor V (de 80 kD y contiene 25 exones) se localiza en 1q21-q25. La proteína codificada tiene un peso de 330 kD, su concentración en el plasma es de aproximadamente 20 nmol/l y consta de los dominios A1-A2-B-A3-C1-C2, que al ser activada por la trombina, o factor X activado, libera al polipéptido B. El factor V es degradado por la PCa mediante la proteólisis secuencial de tres sitios en su cadena pesada: arginina 506 (R506), arginina 306 (R306) y arginina 679 (R679), limitando la generación de trombina.⁶⁻⁸ La ruptura del enlace en la Arg-506 es necesaria para la exposición de los otros dos sitios, dando a la PCa mayor eficacia en todo el proceso.^{8,9}

En 1993, Dahlbäck y colaboradores describieron que en algunos pacientes, la PCa era incapaz de prolongar *in vitro* el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), como habría de esperarse; sin embargo, el plasma de estos pacientes era resistente a la acción de la PCa.³ Bertina y colaboradores, en 1994,¹⁰ describieron que en el gen del factor V, el nucleótido guanina en la posición 1691 del exón 10, es sustituido por una adenina (G1691A); esta mutación induce un nuevo codón que cambia la R en la posición 506 por una glutamina (Q), y como consecuencia una pérdida en la acción proteolítica de PCa, porque al perderse el primer punto de ruptura se rompen con mucha menor eficacia los restantes, lo que se ha denominado resistencia a la proteína C activada (RPCA). Esta mutación fue denominada como factor V Leiden. En 1998, Williamson y colaboradores¹¹ describieron otra mutación en la secuencia del gen del factor V, en la que una citosina sustituye a una guanina en la posición 1091 del exón 7 (G1019C), originando un cambio de arginina por treonina en la posición 306 de la proteína, produciendo una alteración en el segundo punto de corte para la PCa, generando también resistencia, mutación a la que se le denominó Cambridge.

Sin embargo, estas mutaciones no afectan la activación procoagulante normal del factor V, porque la acción de la trombina sobre éste es en R709, R1018 y R1545.¹² La prueba más directa para identificar estas mutaciones es el análisis genético, que incluye la utilización del ADN genómico como molde para la amplificación del fragmento del gen del factor V que contiene estas mutaciones. Se puede detectar la presencia o ausencia de las mutaciones mediante análisis con enzimas de restricción, uso de sondas aleloespecíficas, PCR en tiempo real o secuenciación directa del fragmento de PCR amplificado.¹³ Se sabe que estas alteraciones causan tromboembolismo venoso y también se ha demostrado que están relacionadas con trombosis arterial.¹⁴

El objetivo de este trabajo fue determinar si la RPCA está asociada con las mutaciones Leiden y Cambridge del factor V de la coagulación, así como si la frecuencia de estas mutaciones y la RPCA en la población mestiza mexicana son diferentes a lo informado en la población caucásica.

Material y métodos

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo, en el cual se incluyeron 150 pacientes mexicanos, de padres y abuelos mexicanos, con diagnóstico de trombofilia primaria que acudieron a los servicios de hematología del Hospital General Regional 1, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), del Centro Médico Nacional La Raza, del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS; Hospital General de México e Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. También se incluyeron 100 sujetos sanos para validar el estudio, los cuales se obtuvieron del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

RPCA: método coagulométrico

A partir de plasma citratado de muestras de pacientes e individuos sanos se determinó la RPCA empleando el equipo comercial STA®-Staclo® APCR (Roche Diagnostics). Esta prueba se realizó en un equipo automatizado STA Compact (Roche). Los valores normales para la metodología utilizada fueron más de 120 segundos.

Estudio molecular

La determinación de los genotipos de las mutaciones (factor V Leiden y factor V Cambridge) se realizó mediante PCR-RFLPs. A partir de sangre periférica se obtuvo ADN¹⁵ y se realizó PCR bajo las siguientes condiciones: 100 ng de ADN genómico fueron amplificados utilizando 1.25 U Taq ADN polimerasa manufacturada por Roche, MgCl₂ 1.5 mM, regulador 1X, dNTP's 0.1 mM, 0.06 µM de cada iniciador correspondiente, agua en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificaciones para la mutación Leiden fueron 35 ciclos de un minuto a 95 °C, un minuto a 60 °C, un minuto a 72 °C, con una desnaturalización inicial de cinco minutos a 95 °C, y una extensión final de 90 segundos a 72 °C;¹⁶ para la mutación Cambridge fueron 35 ciclos de 20 segundos a 94 °C, 1.30 minutos a 53° C, con una desnaturalización inicial de cinco minutos a 94 °C y una extensión final de 90 segundos a 74 °C.¹¹ Las amplificaciones se realizaron con un blanco sin ADN. El análisis de RFLPs se realizó con la enzima de restricción Hind III 5U, dos horas a 37 °C para la mutación Leiden¹⁶ y la enzima de restricción BstO I durante toda la noche a 60 °C para la mutación Cambridge,¹¹ revelándose mediante electroforesis en geles de agarosa a 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio.

Oligonucleótidos utilizados para la identificación de las mutaciones: factor V Leiden TTTCTTTTCAGGCAG-GAACAAACACCAGAATC y GGTTACTTCAAGGA-CAAAATACCTGTAAAGCT;¹⁶ factor V Cambridge TGTCTTTCTGTCCTAAC y ACCCGTTTCCAAGT-TCT.¹¹ De acuerdo con los patrones de bandas encontrados con las enzimas de restricción, cada paciente se clasificó en uno de los grupos descritos en el cuadro I.

Análisis estadístico

Se obtuvieron medidas de tendencia central y de dispersión. La comparación de proporciones entre los grupos se llevó a cabo con la prueba de χ^2 . Para comparar las variables cuantitativas del grupo de estudio y el control y de acuerdo con la distribución de los datos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. Las pruebas se consideraron significativas cuando se obtuvo $p < 0.05$. Se utilizó el programa SPSS versión 14.0.

Bioética

Los pacientes y testigos sanos fueron informados del objetivo del estudio y firmaron una hoja de consentimiento informado. Este proyecto fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital General de México, Secretaría de Salud y de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, conforme a los lineamientos de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, y la Organización Mundial de la Salud, modificada en Tokio, Japón.

Cuadro I. Clasificación de los pacientes de acuerdo con los patrones de bandas encontrados con las enzimas de restricción

Grupo	Factor V Leiden (pb)	Factor V Cambridge (pb)
Homocigoto normal	247	162
		66
Heterocigoto	247	228
	215	162
		66
Homocigoto mutado	215	228

Los patrones de bandas se obtienen mediante la enzima Hind III, la cual no corta en individuos homocigotos normales para el factor V Leiden y con la enzima BstOI, que corta en individuos normales para el factor V Cambridge, y se observan al realizar electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

Resultados

Se estudiaron 150 pacientes con diagnóstico de trombofilia primaria (78.7 % con trombosis venosa y 21.3 % con trombosis arterial), seleccionados de acuerdo con los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis y 100 sujetos sin diagnóstico de trombofilia (grupo control), cuyas características se muestran en el cuadro II.

La RPCA positiva se encontró en cuatro pacientes y en un control (cuadro III). Las características clínicas de estos pacientes se describen en el cuadro IV. El rango de edad fue 28 a 30 años, un hombre y tres mujeres, con uno y tres eventos trombóticos, con predominio de trombosis venosa en los miembros pélvicos y cerebral.

La figura 1 muestra un gel de agarosa al 1.5 % con diferentes productos de PCR-RFLPs para la mutación Leiden (A) y para la mutación Cambridge del factor V (B). Se muestra un control positivo para cada mutación; sin embargo, en la población estudiada ninguno de los individuos de los dos grupos la presentó.

Cuadro II. Datos clínicos de los individuos estudiados

	Casos	Controles
n	150	100
Edad promedio (años)	31.5 ± 13.5	31.5 ± 13.5
Sexo		
Mujeres	97 (65 %)	54 (54 %)
Hombres	53 (35 %)	46 (46 %)
Localización de la trombosis	Venosa 118 (78.7 %)	-
	Arterial 32 (21.3 %)	
TVP		
Miembros pélvicos	55	
Mesentérica	4	
EVC	39	-
EVC + miembros pélvicos	1	
TVP + TEP	19	
Trombosis arterial		
EVC	30	-
IAM	2	

Evidentemente los controles no presentaron trombosis, en tanto que los casos tuvieron principalmente trombosis venosa, y las regiones más afectadas fueron los miembros pélvicos y el cerebro. TVP = trombosis venosa profunda, EVC = evento vascular cerebral, TEP = tromboembolia pulmonar, IAM = infarto agudo de miocardio.

Cuadro III. Resultados obtenidos con RPCA

	Pacientes				Individuos sanos				p*
	Anormal	Normal	%	Total	Anormal	Normal	%	Total	
RPCA	4	146	2.7	150	1	99	1	100	0.001

*U de Mann-Whitney.

Como era de esperar, la RPCA fue anormal en algunos pacientes (cuatro); sin embargo, también fue anormal en un control sano, hecho que puede no estar relacionado con factores primarios sino con factores ambientales.

Discusión

La expresión fenotípica de las mutaciones Leiden y Cambridge del factor V es la RPCA, como lo describieron Dahlbäck y colaboradores³ y Williamson y colaboradores,¹¹ condiciona que esta proteína sea incapaz de proteolizar al factor V e inactivarlo para evitar la formación de trombos. En el presente estudio se obtuvo una frecuencia para RPCA de 2.7 % (4/150) en los pacientes y de 1 % (1/100) en los controles sanos (cuadros IV y V). Estos resultados son similares a los informados por Lillicrap y colaboradores¹⁷ en población canadiense (2 %); sin embargo, en los estudios de Ruiz Argüelles y colaboradores,¹⁸ en población mestiza mexicana como la nuestra, se informa que 24 % de un total de 46 pacientes tenía RPCA positiva, lo cual difiere importantemente de nuestros resultados (cuadro V). Majluf y colaboradores, en 2008,¹⁹ obtuvieron una frecuencia de 0.85 % (32/3745) en poblaciones mucho mayores de mestizos mexicanos y 0 % (0/600) de indígenas mexicanos, ambas poblaciones incluyeron sólo individuos sanos. Por otro lado, Kraus y colaboradores²⁰ informan una frecuencia de 20 % en población caucásica, lo cual difiere tanto de la nuestra como de la canadiense ($p < 0.001$).

En nuestro análisis, la RPCA no se debió a la mutación del factor V Leiden ni la de Cambridge. Ruiz Argüelles y colaboradores¹⁸ encontraron la mutación Leiden con una

frecuencia de 11 % en pacientes trombofilicos de Puebla (México), cifra mayor a la señalada en la población caucásica. Para esta misma mutación, en estudios realizados en población latina (chilenos), Palomo y colaboradores²¹ indican frecuencias en pacientes con trombosis de 5.4 y 1.3 % en controles sanos. Genoud y colaboradores,²² en argentinos, en 2.9 % de controles sanos encontraron la mutación heterocigota y no la homocigota. Estudios en población china²³ no mostraron la mutación Leiden en ninguno de los individuos investigados, resultados semejantes a los obtenidos en nuestra investigación. Otros análisis muestran situaciones similares o muy disímiles a las nuestras²⁴⁻²⁶ (cuadro V).

Respecto a la mutación Cambridge, una mutación relativamente rara,²⁷ en nuestra población no se encontró; Williamson y colaboradores,¹¹ en población inglesa, donde se describió esta mutación por primera vez, la registraron en un paciente entre 602 (0.16 %). Yanqing, en población china,²³ menciona que de 346 pacientes, dos presentaron la mutación en forma heterocigota, no encontrándose en 140 controles sanos. En población serbia²⁷ tampoco se identificó.

Los resultados obtenidos en las diferentes poblaciones respecto a los nuestros, RPCA, mutaciones Leiden y Cambridge del factor V fueron diferentes muy probablemente por tratarse de poblaciones genéticamente diferentes^{28,29} (cuadro V).

Cuadro IV. Tipo de evento trombótico y su localización en los pacientes con RPCA anormal

Prueba	Núm. pacientes	Valores de RPCA	Edad (años)	Sexo	Núm. eventos trombóticos	Tipo de trombosis	Localización del trombo
RPCA	4	86.6	30	F	3	Venosa	TVPMPI-TC
		85.9	28	F	1	Venosa	TVPMPD
		91.3	29	M	1	Venosa	TVPMPI
		87.6	28	F	1	Venosa	TVPMPD

Se ha descrito que el tipo de trombosis que principalmente está asociado con la RPCA es el venoso y afecta a hombres y mujeres, hecho confirmado en nuestros pacientes. TVPMPI = trombosis venosa profunda de miembro pélvico izquierdo, TC = trombosis cerebral, TVPMPD = trombosis venosa profunda de miembro pélvico derecho.

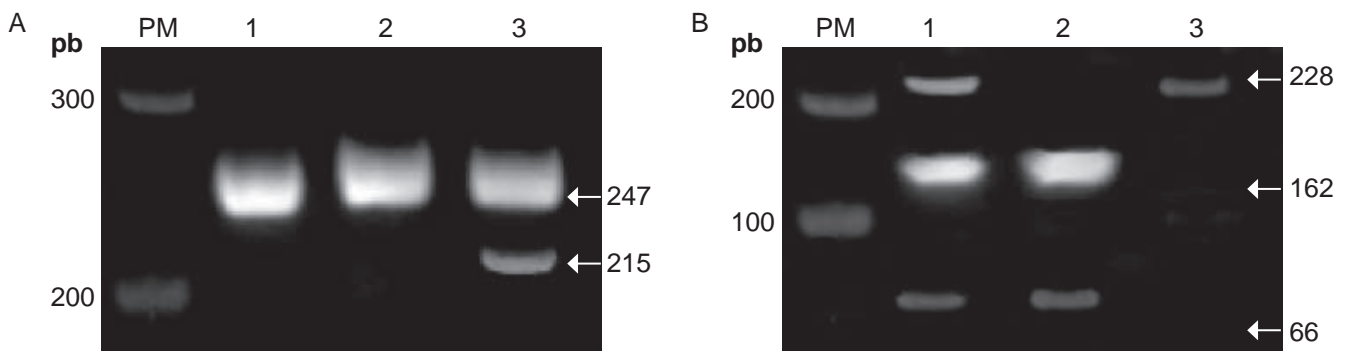


Figura 1. Determinación de las mutaciones mediante PCR-FRLPs. A) Factor V Leiden. 1 y 2, sujeto sano y paciente sin la mutación; 3, control positivo para esta mutación; bandas de 247 y 215 pb correspondientes al patrón de corte con Hind III (heterocigoto). B) Factor V Cambridge. 1, control positivo para la mutación (heterocigoto); 2, sujeto sano; 3, control positivo (homocigoto); bandas de 66 y 162 pb corresponden al patrón de corte con la enzima BstO I (heterocigoto). PM = marcador de peso, pb = pares de bases. Gel de agarosa a 1.5 %.

Es evidente que la presencia genotípica de mutaciones polimórficas es muy distinta en las diversas poblaciones, incluso en poblaciones aparentemente iguales, por ejemplo mestizos mexicanos, debido a que muestran poblaciones

heterogéneas y existen diversos tipos de mestizos mexicanos, por lo que es importante realizar estudios tomando en cuenta que los individuos que conforman la población de estudio sean genéticamente similares.

Cuadro V. Frecuencias obtenidas para RPCA, FVL y FVC en diferentes poblaciones

Autor y colaboradores	Individuos		Población	FVL		FVC		RPCA	
	P	CS		P	CS	P	CS	P	CS
Zavala-Hernández	150	100	Mexicanos	0	0	0	0	2.7	1
Ruiz-Argüelles ¹⁸	46	-	Mexicanos	11	-	-	-	24	-
Majluf ¹⁹	-	4345	Mexicanos	-	-	-	-	-	1.7
Lillicrap ¹⁷	*	*	Canadienses	-	-	-	-	2	-
Kraus ²⁰	*	*	Caucásicos	-	-	-	-	20	-
Palomo ²¹	149	160	Chilenos	5.4	1.3	-	-	-	-
Genoud ²²	-	418	Argentinos	-	2.9	-	-	-	-
Yanqing ²³	346	140	Chinos	0	0	0.57	0	-	-
Eid ²⁴	594	-	Jordanos	25.7	-	-	-	-	-
Ahmed ¹⁴	68	25	Hindúes	7.3	0	-	-	-	-
Akar ²⁵	136	113	Turcos	29.4	7	-	-	-	-
Hessner ²⁶	192	-	Caucásicos	1.8	-	-	-	-	-
Djordjevic ²⁷	175	120	Serbios	29.9	5.8	0	0	-	-
Rosendaal ²⁸	471	474	Holandeses	23	2.9	-	-	-	-
Juul ²⁹	9253	-	Daneses	7.49	-	-	-	-	-
Álvarez ⁸	64	103	Españoles	14.11	0.97	-	-	-	-
Williamsom ¹¹	602	-	Ingleses	-	-	0.16	-	-	-

FVL = factor V Leiden, FVC = factor V Cambridge, - sin datos. *datos no reportados, P = pacientes, CS = controles sanos.

Conclusiones

No se encontraron las mutaciones Leiden ni Cambridge del factor V de la coagulación en la población estudiada y, por consiguiente, la RPCA no correlacionó con estas mutaciones; esto confirma que existen otras causas primarias o secundarias que condicionan RPCA positiva. La frecuencia obtenida para la RPCA en nuestra población trombofílica mestiza mexicana fue menor comparada con la obtenida en población caucásica.

Referencias

- Nizzi FA, Kaplan HS. Protein C and S deficiency. *Semin Thromb Hemost* 1999;25:265-272.
- Völzke H, Wolff B, Grimm R, Robinson DM, Schuster G, Herrmann FH, et al. Interaction between factor V Leiden and serum LDL cholesterol increases the risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2005;180:341-347.
- Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1004-1008.
- Tripodi A. A review of the clinical and diagnostic utility of laboratory tests for the detection of congenital thrombophilia. *Semin Thromb Hemost* 2005;31:25-32.
- Dahlbäck B. Blood coagulation. *Lancet* 2000;355:1627-1632.
- Dahlbäck B. Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood* 1995;85:607-614.
- Lengyel T, Sasvari-Szekely M, Guttman A. High-throughput genotyping of factor V Leiden mutation by ultrathin-layer agarose gel electrophoresis. *J Chromatogr A* 1999;853:519-525.
- Álvarez A, Barroso A, Robledo M, Arranz E, Outeiriño J, Benítez J. Prevalence of factor V Leiden and the G20210A mutation of the prothrombin gene in a random group of patients with thrombotic episodes. *Sangre* 1999;44:7-12.
- Endler G, Mannhalter C. Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis. *Clin Chim Acta* 2003;330:31-55.
- Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-67.
- 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;91:1140-1144.
- Dahlbäck B. Activated protein C resistance and thrombosis: molecular mechanisms of hypercoagulable state due to FVR506Q mutation. *Semin Thromb Hemost* 1999;25:273-289.
- Patrushev LI, Zykova ES, Kayushin AL, Korosteleva MD, Miroshnikov AI, Bokarev IN, et al. New DNA diagnostic system for detection of factor V Leiden. *Thromb Res* 1998;92:251-259.
- Ahmed RP, Gupta PK, Kannan M, Choudhry VP, Saxena R. Factor V Leiden. The commonest molecular defect in arterial and venous thrombophilia in India. *Thromb Res* 2003;110:19-21.
- Montesinos JJ, Sánchez-Valle E, Miranda-Peralta E, Gutiérrez-Romero M, Mayani H. Effect of rhGM-CSF on the kinetics of hematopoiesis in long-term marrow cultures from patients with acute myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002;43:2383-2390.
- Dupérat VG, Fauchon M, Nurden AT, Vergnes C. Simple and rapid combined genetic diagnosis of mutation (1691 G-->A) of the factor V gene and (20210 G--> A) of the prothrombin gene. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998;9:549-551.
- Lillicrap D. Molecular diagnosis of inherited bleeding disorders and thrombophilia. *Semin Hematol* 1999;36:340-351.
- Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Valdés-Tapia P, Gómez-Rangel JD, Reyes-Núñez V, Garcés-Eisele J. Primary thrombophilia in Mexico. V. A comprehensive prospective study indicates that most cases are multifactorial. *Am J Hematol* 2005;78:21-26.
- Majluf-Cruz A, Moreno-Hernández M, Ruiz de Chávez-Ochoa A, Monroy-García R, Majluf-Cruz K, Guardado-Mendoza R, et al. Activated protein C resistance and factor V Leiden in Mexico. *Clin Appl Thromb Hemost* 2008;14:428-437.
- 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;24:337-354.
- Palomo I, Pereira J, Alarcón M, Pinochet C, Vélez MT, Hidalgo P, et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A among Chilean patients with venous and arterial thrombosis. *Rev Med Chil* 2005;133:1425-1433.
- Genoud V, Castañón M, Annichino-Bizzacchi J, Korin J, Kordich L. Prevalence of three prothrombotic polymorphisms: factor V G1691A, factor II G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C 677T in Argentina. On behalf of the Grupo Cooperativo Argentino de Hemostasia y Trombosis. *Thromb Res* 2000;100:127-131.
- Yanqing H, Fangping C, Qinzhi X, Zaifu J, Guangping W, Xiaoxia Z, et al. No association between thrombosis and factor V gene polymorphisms in Chinese Han population. *Thromb Haemost* 2003;89:446-451.
- Eid SS, Shubeilat T. Prevalence of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR G677A among 594 thrombotic Jordanian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005;16:417-421.
- Akar N, Yilmaz E, Akar E, Avcu F, Yalçın A, Cin S. Effect of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish deep vein thrombotic patients with and without FV1691 G-A. *Thromb Res* 2000;97:227-230.
- Hessner MJ, Luhm RA, Pearson SL, Endean DJ, Friedman KD, Montgomery RR. Prevalence of prothrombin G20210A, factor V G1691A (Leiden), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T in seven different populations determined by multiplex allele-specific PCR. *Thromb Haemost* 1999;81:733-738.
- Djordjevic V, Rakicevic LJ, Mikovic D, Kovac M, Miljic P, Radokovic D, et al. Prevalence of factor V Leiden, factor V Cambridge, factor II G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations in healthy and thrombophilic Serbian populations. *Acta Haematol* 2004;112:227-229.
- 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;85:1504-1508.
- Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. Factor V Leiden and the risk for venous thromboembolism in the adult Danish population. *Ann Intern Med* 2004;140:330-337.