

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología



**Desarrollo de un nuevo método para la detección de las mutaciones
más frecuentes en los principales genes implicados en la trombofilia
hereditaria**

Tesis Doctoral

Mercedes Zafra Ceres

Granada, 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Mercedes Zafra Ceres
D.L.: GR 4509-2011
ISBN: 978-84-694-5732-0



**D. JOSÉ ANTONIO GÓMEZ CAPILLA,
CATEDRÁTICO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

CERTIFICA:

Que D^a. M^a Mercedes Zafra Ceres, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado DESARROLLO DE UN NUEVO MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES MÁS FRECUENTES EN LOS PRINCIPALES GENES IMPLICADOS EN LA TROMBOFILIA HEREDITARIA. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2011

Fdo: Prof. Dr. D. J. A. Gómez Capilla



**D. TOMÁS DE HARO MUÑOZ, DIRECTOR DE LA U.G.C DE
LABORATORIOS Y JEFE DE SERVICIO DE ANÁLISIS
CLÍNICOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN CECILIO
DE GRANADA**

CERTIFICA:

Que D^a. M^a Mercedes Zafra Ceres, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado **DESARROLLO DE UN NUEVO MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES MÁS FRECUENTES EN LOS PRINCIPALES GENES IMPLICADOS EN LA TROMBOFILIA HEREDITARIA**. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2011

Fdo. Dr. D. Tomás de Haro Muñoz



**D. RICARDO SOLA GARCÍA FACULTATIVO ESPECIALISTA
DEL ÁREA DE HEMATOLOGÍA DEL SERVICIO ANDÁLUZ
DE SALUD**

CERTIFICA:

Que D^a. M^a Mercedes Zafra Ceres, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado **DESARROLLO DE UN NUEVO MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES MÁS FRECUENTES EN LOS PRINCIPALES GENES IMPLICADOS EN LA TROMBOFILIA HEREDITARIA**. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2011

Fdo. Dr. D. Ricardo Sola García

A mis padres y hermanos.

A Jose, por todo.

Agradecimientos

En el momento de llegar al final es cuando uno se da cuenta del camino recorrido, si ha sido largo, difícil, complejo, si ha habido buenos ratos o si ha merecido la pena; pero sobretodo es cuando uno no puede dejar de recordar a todas esas personas que le han ayudado a recorrerlo y a llegar a buen puerto. Por eso quiero dedicar unas líneas a algunas de estas personas. Sin duda olvidaré muchas pero a todas ellas gracias, siempre gracias.

En primer lugar me acuerdo de mis directores de tesis: al Dr. Gómez Capilla le debo toda esta tesis por eso quiero agradecerle su paciencia, su dedicación y su buen ánimo. Al final no sé muy bien si era mi director, mi padre o mi amigo, creo que las tres cosas., lo que sí sé es que sin duda es mi maestro y que sin él no habría sido posible. Al Dr. De Haro quiero agradecerle haberme brindado la oportunidad de hacer la tesis así como haberme ayudado en todo lo que he necesitado. Y al Dr. Sola quiero agradecerle todo su apoyo y su coherencia a la hora de elaborar esta tesis.

También han resultado imprescindibles el Dr. Poyatos (gracias Antonio por haberme echado tantos cables) y la Dra, M^a Teresa Miranda por el gran trabajo realizado en el tratamiento estadístico y sin cuya ayuda hoy no estaríamos aquí. Gracias igualmente a la Dra Carolina Gómez por su apoyo.

Volviendo la vista atrás, muy atrás, lo primero que recuerdo, académicamente hablando, es mi colegio; sin duda responsable de lo bueno o lo malo que he hecho. Muchas gracias a la Srta. Maloles y a la Srta. Ana Suárez que tanto me ayudaron. Y gracias también a mis amigas todavía después de tantos años: Angeli, Isabel, Rocío y sobretodo Patricia.

Después, ya en la Facultad de Farmacia, gracias a todos los que me hicieron recuperar el gusto y el ánimo por estudiar. Desde profesores hasta compañeros de promoción y amigos para siempre como Carlos o como “e

comando”. Gracias a Alex, Borja y Evaristo por haberme aguantado y seguir haciéndolo aún. Todavía en la facultad quiero agradecer que me iniciaran en el mundo de la investigación y el laboratorio, por aquel entonces haciendo ensayos de dureza y disolución a comprimidos. Por ello muchísimas gracias al Dr. César Viseras que me metió en este mundo, a la Dra. Pilar Cerezo por su aliento constante y a mi gran amiga la Dra. Cárola Aguzzi por tantas y tantas cosas. No quiero olvidarme de mis compis de laboratorio por aquella época Angeles y Joaquina ni tampoco, y siguen pasando los años, de mis compis “fireras” M^a Carmen y Pilo, mi gemela uoo uoo.

Y llegó el momento de empezar mi residencia en el hospital. Muchas gracias a todos, adjuntos, técnicos (más bien “Técnicas” sobretodo de urgencias), algunas de ellas ya amigas como Mari Pepa y como no, a mis “erres” tanto mayores: gracias Antonio Cruz por tantos cafés, como “coerres”: gracias Kawtar por ser como eres y también pequeñas como Pepi, Susana García etc...No puedo ni quiero olvidarme de mis compañeras en el Laboratorio de Biología Molecular; gracias a Adelaida y gracias a Loli que ha estado conmigo en todos los momentos, buenos y malos, sabes que te quiero mucho. Ah, por último pero en primer lugar mis gracias más profundas a mi compañera y amiga Susana Bueno por haber compartido tantas cosas, especialmente por esos calicasas...que algún día debemos retomar.

Llegando al final, le toca el turno a mi familia. Me acuerdo de mi abuelo Rafael al que le hubiera gustado tanto leer esto, de mi abuelo Manuel, de Anita y de mi tía Conchi a la que debo tanto. Ellos ya no están aquí pero esta tesis también es suya. Muchas gracias abuela, por todo lo que tú y yo sabemos, te quiero mucho. Gracias a mis hermanos Carlos, Carmen y Ana por haber hecho que seamos una FAMILIA no perfecta pero sí única y especial. Gracias también a mis sobrinos Marta, Bea y Ernesto por arrancarme cada día una sonrisa. Y todas las gracias del mundo a mis padres, lo que soy es gracias a vosotros que siempre me habéis apoyado y creído en mí más que

misma. Este momento es posible porque siempre habéis estado a mi lado, sobre todo cuando no ha sido tan fácil pero creo que al final el esfuerzo ha merecido la pena.

Ya acabo, y para ello me dejo a la persona que más quiero en el mundo. Gracias Jose por todo lo que me das cada día. Esta tesis es para ti.

ÍNDICE

ÍNDICE

Glosario de abreviaturas	23
I. INTRODUCCIÓN	27
I.1. Introducción a la hemostasia	29
I.1.2. Modelo celular del sistema hemostático	31
I.1.2.1. Fase 1: Iniciación	32
I.1.2.2. Fase 2: Amplificación	33
I.1.2.3. Fase 3: Propagación	34
I.1.3. Anticoagulación: sistemas anticoagulantes naturales	37
I.1.4. Fibrinolisis	38
I.2. Alteraciones de la coagulación: trombofilias	40
I.2.1. Introducción	40
I.2.2. Tipos de trombofilias	43
I.2.2.1. Trombofilia hereditaria	43
I.2.3. Bases moleculares de la trombofilia hereditaria	45
I.2.3.1. Deficiencia de antitrombina	45
I.2.3.2. Deficiencia de Proteína C	46
I.2.3.3. Deficiencia de proteína S	48
I.2.3.4. Resistencia a la proteína C activada	49
I.2.3.4.1. Factor V Arg506Gln	50

I.2.3.4.2. Otras mutaciones en el gen del Factor V	53
I.2.3.5. Mutación PT20210A	54
I.2.3.6. Polimorfismo en el gen del Factor XIII	57
I.2.3.7. Mutación C46T en el gen del factor XII	58
I.2.3.8. Grupo sanguíneo ABO	59
I.2.3.9. Niveles elevados de factores de la coagulación	59
I.2.3.9.1. Incremento de los niveles del Factor VIII	59
I.2.3.9.2. Incremento de los niveles de Factor IX y Factor XI	60
I.2.3.9.3. Incremento de los niveles de Fibrinógeno	61
I.2.3.10. Hiperhomocisteinemia	61
I.2.3.11. Disfibrinogenemia	63
I.2.3.12. Otros factores genéticos de riesgo trombótico	64
I.2.4. Trombofilias adquiridas	68
I.2.4.1 Síndrome antifosfolípido	69
I.2.5. Trombofilia y embarazo	69
I.2.6. Trombofilia y estrógenos	70
I.3. Diagnóstico de trombofilias	71
I.3.1. Pruebas en el laboratorio general	71
I.3.2. Diagnóstico molecular de trombofilias	74
I.4. El futuro de la trombofilia	75

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	79
III. MATERIAL Y MÉTODOS	83
III.1. Pacientes	83
III.2. Extracción de DNA	83
III.2.1. Cuantificación del DNA extraído	85
III.3. Análisis de las mutaciones en los genes de la PT, FV, MTHFR y FXII	86
III.3.1. Obtención de los amplicones para la detección de las mutaciones de los genes de la PT, FV, MTHFR y FXII	86
III.3.1.2. Protrombina	86
III.3.1.3. Factor V	88
III.3.1.4. MTHFR	90
III.3.1.5. Factor XII	91
III.3.2. Procedimiento para la amplificación de los amplicones donde se localizan las mutaciones a detectar	93
III.3.3. Limpieza de los productos amplificados	95
III.3.4. Detección SnaPSHOT	95
III.3.5. Electroforesis capilar y detección fluorescente	98
III.3.5.1. Preparación de los productos amplificados	99
III.3.5.2. Preparación del equipo	99

III.3.5.3. Programación de las muestras	101
III.3.5.3.1. Hoja de muestras (“sample sheet”)	101
III.3.5.3.2. Lista de inyección	102
III.3.5.4. Análisis de los resultados	105
III.4. Pruebas de laboratorio	105
III.4.1. Batería de pruebas del estudio de trombofilia	105
III.4.2. Instrumentación requerida	107
III.5. Método Estadístico empleado	107
III.5.1. Estadística descriptiva	108
III.5.2. Estadística inferencial	109
IV. RESULTADOS	115
IV.1. Establecimiento del método de análisis de las mutaciones de los genes de la PT, FV, MTHFR y FXII	115
IV.2. Resultado del tratamiento estadístico de los datos obtenidos con la aplicación del método de análisis	132
V. DISCUSIÓN	159
VI. CONCLUSIONES	177
VII. BIBLIOGRAFÍA	183
VIII. ANEXO RESULTADOS	211

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A: Adenina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

aCL: anticuerpos anticardiolipina.

aPL: anticuerpos antifosfolípido.

APTT: Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada.

AT: Antitrombina.

C: Citosina.

EP: Embolismo pulmonar.

EPCR: Receptor Endotelial de la Proteína C.

ETV: Enfermedad tromboembólica venosa.

FIX: Factor IX de la coagulación.

FT: Factor tisular.

FV: Factor V de la coagulación.

FVa: Factor V activado.

FVIII: Factor VIII de la coagulación.

FVL: Factor V de Leiden.

FvW: Factor de von Willebrand.

FXI: Factor XI de la coagulación.

FXIII: Factor XIII de la coagulación.

G: Guanina.

HOM: Homocigoto.

HT: Heterocigoto.

LA: Anticoagulante Lúpico.

MTHFR: Metilentetrahidrofolatoreductasa.

NPM: No presenta mutación.

nt: Nucleótido.

OR: Odds Ratio: cociente o razón entre 2 *odds*. A su vez la *odds* es una razón en la que el numerador es la probabilidad (p) de que ocurra un suceso y el denominador es la probabilidad de que tal suceso no ocurra (1-p). La OR es una medida clásica en epidemiología de la asociación entre un factor de riesgo y una enfermedad.

Pb: pares de bases.

PC: Proteína C.

PCA: Proteína C activada.

PCAr: Resistencia a la proteína C activada.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PS: Proteína S.

PT: Protrombina.

SERMs: moduladores selectivos se receptores estrogénicos.

SNPs: cambio de un solo nucleótido.

T: Timina.

TAFI: Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina.

TFPI: Inhibidor de la vía del factor tisular.

TP: Tiempo de protrombina.

t-PA: Activador tisular del plasminógeno.

TT: Tiempo de Trombina.

TTPA: Tiempo de tromboplastina parcial activado.

TVP: Trombosis venosa profunda.

Vs: “versus”.

Xa: Factor X activo.

XIIa: Factor XII activado.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. INTRODUCCIÓN A LA HEMOSTASIA.

La hemostasia es un sistema de defensa del organismo para prevenir la hemorragia logrando, en condiciones fisiológicas, que la sangre esté en estado fluido y permitiendo al mismo tiempo reaccionar ante una lesión del vaso sanguíneo con el objetivo de detener el sangrado taponando la posible lesión vascular, todo ello de forma muy rápida. La hemostasia comprende un sistema de coagulación y un sistema de fibrinólisis compuestos ambos por numerosos activadores, inhibidores, cofactores e incluso superficies celulares como las de las plaquetas que desempeñan un papel fundamental en todo el proceso. Simplificando la complejidad del proceso, existe un equilibrio entre un mecanismo procoagulante que favorece la hemostasia y la trombosis y un mecanismo anticoagulante encargado de prevenir la excesiva formación de trombina cuando se activa la coagulación. Este equilibrio está regulado por la activación, inactivación o inhibición de los factores de la coagulación y de los factores fibrinolíticos, o modulando los niveles de los mismos.

Clásicamente se ha dividido la hemostasia en hemostasia primaria, en la que participan fundamentalmente las plaquetas a través de los procesos de adhesión, reclutamiento, activación y agregación para formar el tapón hemostático plaquetar inicial y fase de coagulación sanguínea (hemostasia secundaria). La deficiencia o anomalía del sistema hemostático conlleva una tendencia hemorrágica (ej. hemofilia) mientras que una activación excesiva puede resultar en trombosis que ocluye la luz del vaso (ej. trombosis venosa).

En la década de los 60 se propuso un modelo de coagulación que contemplaba una “cascada” enzimática compuesta por una serie de etapas

secuenciales en las que la activación de un factor de coagulación activa al siguiente, para favorecer la generación del enzima activo trombina, que convierte una proteína soluble del plasma, el fibrinógeno, en una proteína insoluble, la fibrina, componente estructural del coagulo. Según el modelo clásico de *Macfarlane* y *Davie* (1964) existirían dos vías de activación, intrínseca y extrínseca, iniciadas por el factor XII en la intrínseca y por el complejo factor tisular (FT)/ factor VII en la vía extrínseca que convergen en una vía común a nivel del factor X activo (Xa). El complejo resultante compuesto por el factor Xa, Ca⁺⁺ y factor Va a nivel de superficies fosfolipídicas favorecería la generación de trombina así como la formación de fibrina. Por otra parte el papel de las plaquetas para terminar en agregación se consideraba un proceso independiente. Este esquema sigue siendo útil para explicar las pruebas de laboratorio empleadas en la monitorización de la hemostasia, como el tiempo de protrombina (TP) para la vía extrínseca y el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) para la intrínseca. Sin embargo pronto se comprobó que ambas vías no operan de forma independiente y que el déficit de factores de la vía intrínseca que prolongan el TTPA no conlleva el mismo riesgo hemorrágico. Por ejemplo, las deficiencias de factor XII no cursan con hemorragia y las del factor XI pueden cursar con hemorragia leve, mientras que las deficiencias de los factores VIII y IX (hemofilia A y B respectivamente) conllevan hemorragias graves. Además se observó el hecho de que el complejo FT/VII no solo activa el factor X sino también el factor XI llegando a la conclusión de que la vía extrínseca sería la de mayor relevancia fisiopatológica *in vivo*. (*Hoffman et al., 2001; Furie et al., 2005*)

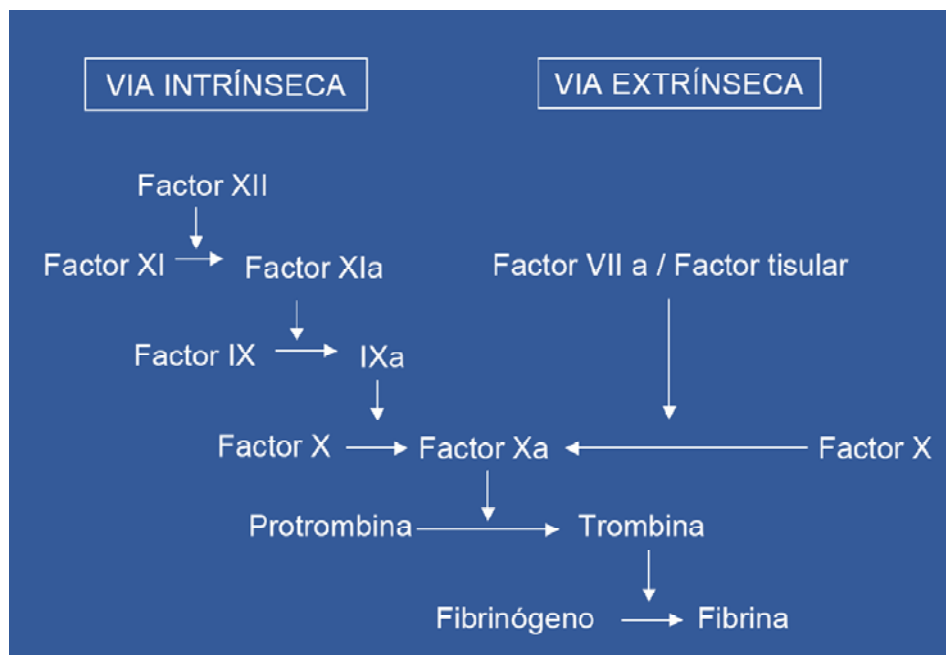


Figura 1. Esquema simplificado de la cascada de la coagulación. (Páramo et al., 2009)

I.1.2 Modelo celular del sistema hemostático.

En la actualidad está demostrada la importancia del componente celular en el proceso de coagulación; sin el concurso de las plaquetas la hemostasia no es posible. Además el FT es una proteína que está presente en la membrana de diversas células como los fibroblastos y hoy en día sabemos que diferentes células expresan proteínas procoagulantes y anticoagulantes, además de receptores para diversos componentes de la hemostasia, lo que ha supuesto un nuevo paradigma para explicar las reacciones que tienen lugar durante el proceso hemostático. (Páramo et al., 2009).

Actualmente se considera que la coagulación se produce en tres etapas relacionadas entre sí: La *fase de iniciación*, que tiene lugar a nivel de células productoras de FT (monocitos o fibroblastos) y que conlleva la generación de los factores Xa, IXa y pequeñas cantidades de trombina que son suficientes para iniciar el proceso. La *fase de amplificación* se localiza en la superficie de las plaquetas que son activadas por la trombina generada y que acumulan factores y cofactores en su superficie permitiendo que se desarrollen diversas reacciones enzimáticas. Por último en la *fase de propagación* las proteasas se combinan con los cofactores en la superficie de las plaquetas promoviendo la generación de grandes cantidades de trombina que favorecen la formación de fibrina y su posterior polimerización para dar lugar a un coágulo estable.

I.1.2.1 Fase 1: Iniciación: exposición del factor tisular tras la lesión vascular.

El FT es el principal iniciador de la coagulación *in vivo* y un componente integral de la membrana celular. Se expresa en numerosos tipos celulares estando presente en monocitos circulantes y en células endoteliales en respuesta a procesos inflamatorios.

El proceso hemostático se inicia tras una lesión vascular, al contactar el subendotelio con la sangre circulante se favorece la unión del FT con el factor VII circulante y su posterior activación. El complejo FT/VIIa activa a los factores IX y X. El factor Xa se combina con el factor Va en la superficie celular produciendo como consecuencia pequeñas cantidades de trombina que jugarán un papel importante en la activación de las plaquetas y del factor VIII durante la siguiente fase. (Mackman *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2006).



Figura 2A. Fase de iniciación. (Páramo *et al.*, 2009).

I.1.2.2 Fase 2: Amplificación.

El daño vascular favorece el contacto entre las plaquetas y otros componentes plasmáticos con tejidos extravasculares. Las plaquetas se adhieren a la matriz subendotelial siendo activadas en lugares donde se ha expuesto el FT. Las pequeñas cantidades de trombina generadas amplifican la señal procoagulante inicial activando los factores V, VIII y XI que se ensamblan en la superficie plaquetar para promover ulteriores reacciones en la siguiente fase. (Monroe *et al.*, 1994; Oliver *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2008).

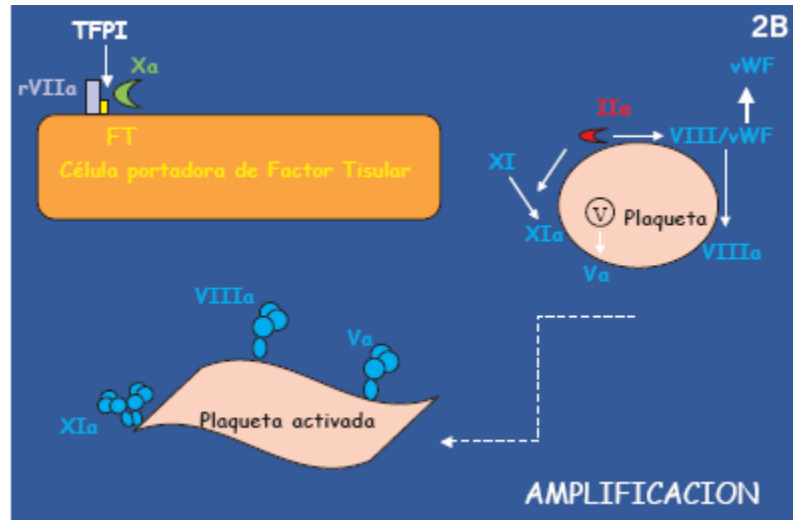


Figura 2B. Fase de amplificación. (Páramo *et al.*, 2009).

I.1.2.3 Fase 3: Propagación.

Durante esta fase el complejo “tenasa” (VIIIa, IXa, Ca⁺⁺ y fosfolípidos) cataliza la conversión del factor Xa mientras que el complejo “protrombinasa” (Xa, Va, Ca⁺⁺ y fosfolípidos) cataliza, a nivel de la superficie plaquetar, la conversión de protrombina en grandes cantidades de trombina (“explosión de trombina”), necesarias para la formación de un coágulo estable de fibrina. La protrombinasa es 300.000 veces más activa que el factor Xa en catalizar la activación de protrombina. La trombina generada activaría asimismo al factor XIII o factor estabilizador de fibrina y a un inhibidor fibrinolítico (TAFI) necesarios para la formación de un coágulo de fibrina resistente a la lisis. (Mann *et al.*, 2003; Crawley *et al.*, 2007).

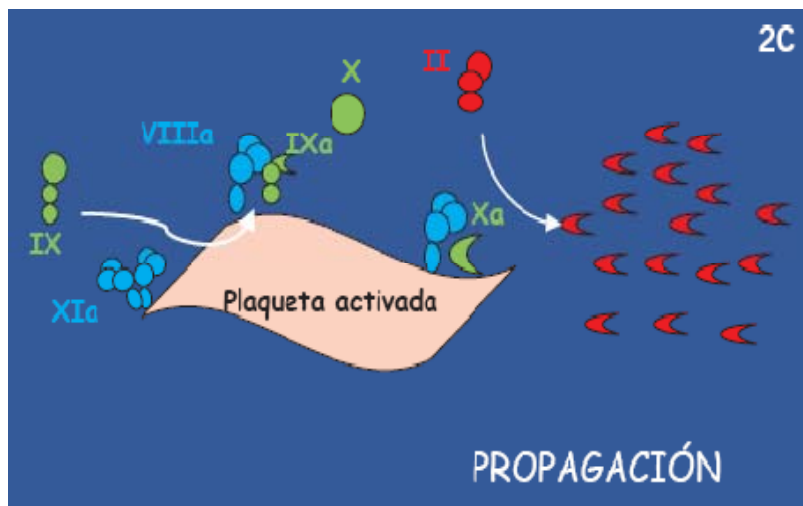


Figura 2C. Fase de propagación. (Páramo *et al.*, 2009).

En consecuencia, según el modelo celular actual de la hemostasia, la coagulación fisiológica depende de la exposición de FT (subendotelial), que se pone en contacto en el lugar de la lesión con el factor VIIa y del ensamblaje de las reacciones de coagulación a nivel de superficies celulares como las plaquetas, lo que favorece la formación de trombina a nivel local y la generación de un coágulo estable de fibrina.

Este modelo contempla una vía única y la focalización del proceso en las superficies celulares.

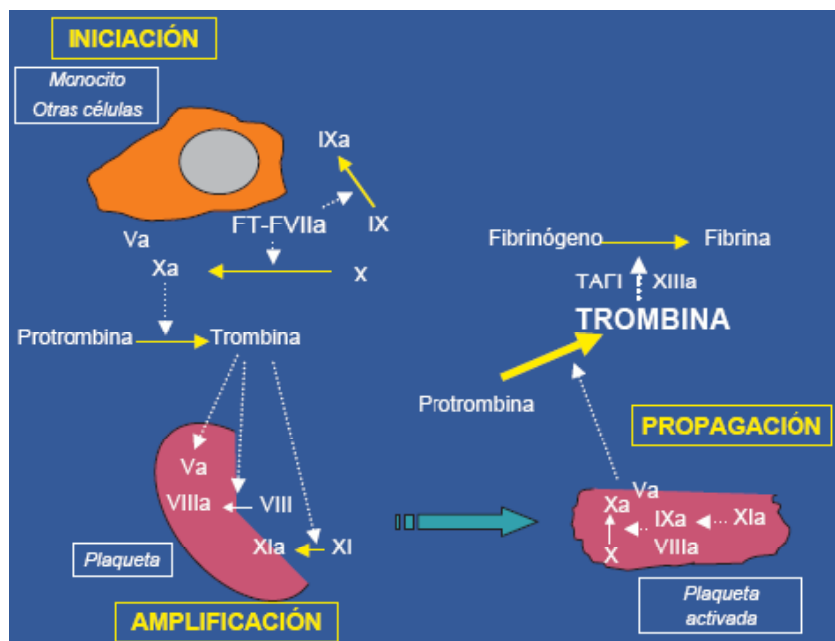


Figura 3. Modelo celular de la coagulación integrando las vías intrínseca y extrínseca. (Páramo et al., 2009).

El modelo clásico de coagulación que contemplaba dos vías independientes no permite explicar los procesos fisiopatológicos que ocurren cuando se produce una lesión vascular. Dicho modelo ha sido sustituido por un modelo celular, más acorde con los mecanismos que tienen lugar *in vivo*. Dicho modelo contempla el papel crucial de las plaquetas y de otros elementos celulares que, de forma coordinada, favorecen la generación de trombina a nivel de la superficie lesionada y la formación de suficientes cantidades de trombina para estabilizar el coágulo y detener la hemorragia.

I.1.3 Anticoagulación: sistemas anticoagulantes naturales.

El sistema de la coagulación debe estar exquisitamente regulado para mantener la hemostasia, para ello debe evitar la generación de excesivas cantidades de trombina.

Esto se lleva a cabo por acción de sistemas anticoagulantes naturales, presentes a nivel del endotelio vascular, siendo los más importantes el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), la antitrombina y el sistema de la proteína C.

El TFPI se une al complejo FT/FVII impidiendo la fase inicial de la coagulación. Su principal lugar de producción son las células endoteliales. Se encuentra principalmente unido a lipoproteínas en sangre o a heparán sulfato y entre un 5- 10% circula en forma libre. La actividad anticoagulante del TFPI se desarrolla en 2 etapas: primero forma un complejo reversible estequiométrico 1:1 con el FXa produciendo la pérdida de su actividad catalítica. En la segunda etapa, el complejo FXa-TFPI se une al complejo FVIIa-TF unido a la membrana en una reacción que necesita iones Ca^{++} formándose el complejo cuaternario FXa-TFPI-FVIIa-TF inhibiendo de esta manera el complejo FVIIa-TF.

La antitrombina inhibe la trombina y otros factores de la coagulación como FXa y FIXa (*van Boven., 1997*). La AT es por sí misma un inhibidor de baja potencia, pero incrementa su velocidad inhibitoria unas 1000 veces en presencia de heparina (anticoagulante). La heparina tiene su equivalente *in vivo*, en el proteoglicano sulfato de heparán presente en el endotelio vascular. La molécula de AT se une a la molécula de heparina a través de una secuencia discontinua de residuos básicos (Lys, Arg) en la zona aminoterminal. La trombina se une también a la cadena de heparina de una manera no específica mediante cargas electrostáticas. De esta manera se forman complejos ternarios de heparina-AT-trombina en los que el sitio activo de la trombina se acerca al sitio reactivo de la AT. El FXa y otros factores activados de la coagulación se

unen de manera débil a la heparina y son inhibidos por el complejo heparina-antitrombina gracias al cambio conformacional que induce la heparina en la molécula de antitrombina. Por el contrario, a nivel del endotelio existen glicosaminoglicanos con afinidad por la antitrombina que inhiben a esta favoreciendo la generación de trombina.

Finalmente, **el sistema de la proteína C** se activa a nivel del endotelio por la trombina, en presencia de un receptor endotelial, la trombomodulina. La proteína C circulante se une a otro receptor específico de naturaleza endotelial (EPCR). El complejo formado por estas proteínas permite la rápida conversión de proteína C en proteína C activada (PCa) que, en colaboración con la proteína S como cofactor, inhibe los factores V y VIII, disminuyendo la generación de trombina, además de poseer otras propiedades anticoagulantes y antiinflamatorias. (*Esmon et al., 2003; López-Sagaseta et al., 2007; Medina et al., 2008; Dalback et al., 2009*).

Hay que indicar que el déficit congénito o adquirido de los sistemas anticoagulantes favorece el desarrollo de trombosis.

I.1.4 Fibrinólisis.

La fibrinólisis es un mecanismo esencial para eliminar los coágulos de fibrina durante el proceso de cicatrización, así como para remover los coágulos intravasculares con el objetivo de impedir la trombosis. El efector final del sistema es la plasmina, que degrada la fibrina en productos de degradación (PDF y dímero D) (Figura 4). La plasmina es producida a partir de un precursor inactivo, el plasminógeno, por acción de dos activadores del plasminógeno: un activador tisular (t-PA) y un activador tipo urocinasa (u-PA). La regulación de los activadores tiene lugar por la acción de inhibidores (PAI), de los que el más relevante es el PAI-1, mientras que la plasmina circulante es rápidamente

inhibida por la α 2- antiplasmina, lo que evita una fibrinólisis sistémica. (Cererman-Maus et al., 2005; Fay et al., 2007; Rijken et al., 2009).

La fibrinólisis se inicia por el t-PA liberado desde el endotelio en respuesta a diversos estímulos (trombina, oclusión venosa, ejercicio físico, etc.). Una vez liberado se une a la fibrina donde activa el plasminógeno a plasmina que degrada la fibrina del coágulo. La trombina puede activar otro inhibidor fibrinolítico, el TAFI (inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina), el cual promueve la estabilización de la malla de fibrina y en consecuencia de la formación del trombo de fibrina persistente. El TAFI actúa mediante la lisis de residuos lisina C-terminal de la fibrina, previniendo la unión del plasminógeno, la plasmina, o el t-PA a la fibrina e inhibiendo secundariamente la fibrinólisis. (Nesheim et al., 1986).

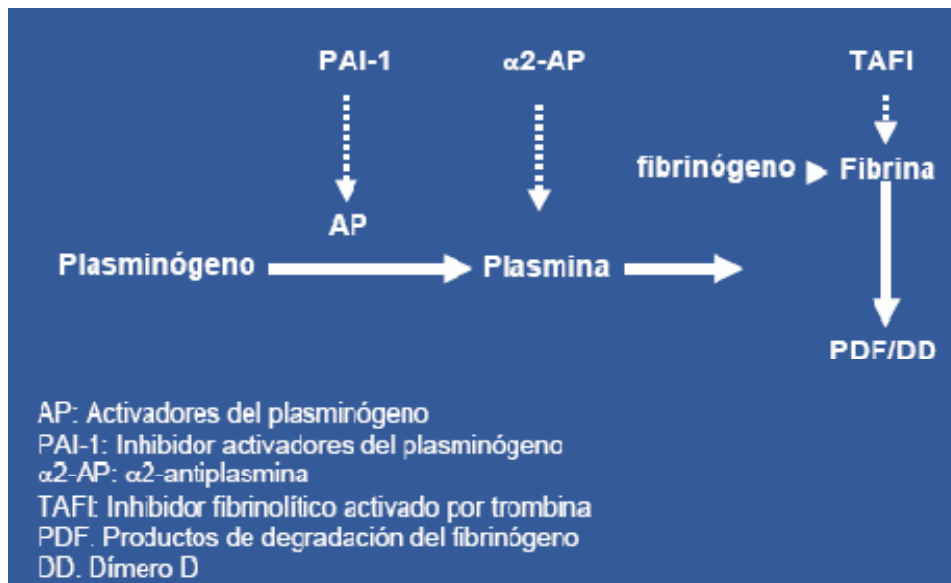


Figura 4. Sistema fibrinolítico.

I.2. ALTERACIONES DE LA COAGULACIÓN: TROMBOFILIAS.

I.2.1. Introducción.

La trombosis tiene un papel crucial en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares y es el principal responsable del desenlace fatal del infarto agudo de miocardio, los accidentes cerebrovasculares tromboembólicos y el tromboembolismo venoso. *Virchow* hace más de 150 años postuló que la trombosis intravascular era causada por cambios en la pared vascular, por reducción en el flujo sanguíneo y por alteraciones de la composición química de la sangre.

La trombofilia puede ser definida como un desorden de la coagulación que implica una predisposición a la trombosis (*League et al., 2005*). En este sentido es definida por la OMS como “tendencia genéticamente determinada al Tromboembolismo venoso”. Es decir, una predisposición individual a padecer episodios tromboembólicos. Se trata de un trastorno del sistema sanguíneo, con formación de coágulos a partir de sus constituyentes, generando lo que se conoce con el nombre de trombosis. Aunque el término trombofilia se ha empleado para referirse a la trombosis arterial se utiliza más frecuentemente en el contexto de la enfermedad tromboembólica venosa (ETV), para describir la susceptibilidad genética a padecer dicho tromboembolismo venoso. En estos pacientes la aparición del accidente trombótico sucede ya en la juventud, suele haber historia trombótica familiar, con trombosis recurrentes, en localizaciones inusuales o presentan una severidad desproporcionada al estímulo causal. La presencia de un factor hereditario predispone hacia la clínica trombótica, sin embargo, para

llegar a desarrollar la enfermedad, en ocasiones se requiere la interacción con otros factores genéticos o ambientales.

La ETV afecta, según diferentes estudios, entre 1 y 1.5 personas de cada mil. (Silverstein *et al.*, 1998; Kearon *et al.*, 2001). Se estima que en Europa se producen más de 1,5 millones de casos de ETV anuales, con 543.500 defunciones, 435.000 casos de embolismo pulmonar (EP) y 684.000 casos de trombosis venosas profundas (TVP sintomáticas). (Estudio Vitae. 2005.). Además el EP, que es una complicación de la ETV tiene una alta morbilidad como causa de muerte en pacientes hospitalizados. Un paradigma reciente de la trombofilia sugiere que el tromboembolismo es una enfermedad de origen multifactorial en la que están implicados uno o más trastornos genéticos asociados con factores de riesgo adquiridos como la inactividad, traumatismos, enfermedades malignas, inflamación, embarazo, empleo de anticonceptivos orales o enfermedades autoinmunes.(Goodnight y Griffin., 2005). Es por ello que puede resultar difícil identificar sus causas y predecir el riesgo.

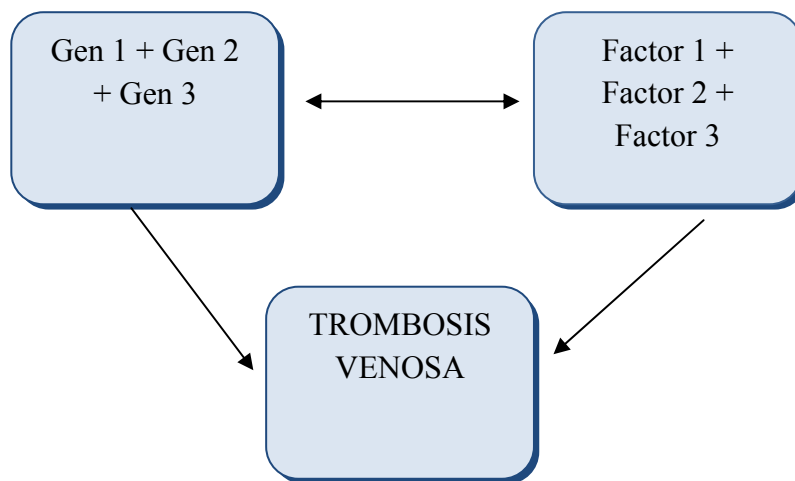


Figura 5. . La trombosis venosa como enfermedad compleja puede ser debida a la interacción de factores de riesgo genéticos y ambientales.

Tabla 1. Principales causas de trombosis venosa congénitas y adquiridas.

Factores de riesgo genéticos

Deficiencia de AT	Deficiencia de PC	FVL
Deficiencia de PS	RPCa	
Disfibrinogenemia	PT20210A	

Factores con regulación genética y ambiental

Niveles elevados de FVIII, FIX, FXI
Hiperhomocisteinemia

Factores de riesgo adquiridos

Cirugía y traumatismo	Inmovilización prolongada
Edad avanzada	Anticuerpos antifosfolípido
Trombosis previas	Embarazo y puerperio
Uso de anticonceptivos orales	Cáncer
Terapia hormonal sustitutiva	RPCa adquirida

I.2.2. Tipos de trombofilias.

La trombofilia se puede dividir en dos categorías básicas: adquiridas y hereditarias.

Las trombofilias adquiridas se presentan con predominio de la vasoconstricción y de la agregación plaquetaria. Se las puede clasificar, según Latino et al., en circunstanciales y propiamente dichas. En las primeras se encuentran factores que al dejar de manifestarse hacen que el riesgo de padecer trombofilia decrezca considerablemente; por ejemplo obesidad, sedentarismo, inmovilización, lesión endotelial, uso de anticonceptivos orales, embarazo y puerperio, neoplasias, traumatismos, sepsis, cirugías, etc. Las trombofilias adquiridas propiamente dichas más frecuentes son el Síndrome Antifosfolipídico y la Hiperhomocisteinemia.

I.2.2.1. Trombofilia hereditaria.

La trombofilia hereditaria o congénita se define como un incremento del riesgo de trombosis determinado genéticamente. Existe una predisposición genética entre el 60 y el 70% de los pacientes con ETV (*Buchanan et al, 2003*). La primera descripción de la trombofilia hereditaria producida por un déficit de la proteína anticoagulante fue realizada por Egeberg en 1965. Los miembros de la familia descrita con la enfermedad sufrían trombosis venosas recurrentes, y el trastorno tenía un patrón de herencia autosómica dominante. El plasma de la familia afectada presentaba una disminución de los niveles de factor inhibidor de la trombina, antitrombina III y el trastorno tenía un patrón de herencia autosómica dominante. A partir de este momento han sido estudiadas numerosas deficiencias de factores de la coagulación y del sistema fibrinolítico para determinar su posible papel en la trombofilia hereditaria (tabla 1). A

principios de los ochenta se describieron los primeros pacientes con una deficiencia de proteína C y trombosis (*Griffin et al., 1981*). Posteriormente fue descrito el déficit de proteína S (*Schwarz et al., 1984; Comp et al., 1984*). Ya en los 90 se describieron tres familias con trombosis venosa asociada con la resistencia a la proteína C activada (*Dahlback et al., 1993*) y en 1994 el defecto genético asociado fue descrito de forma simultánea por tres laboratorios afectando a una mutación del gen del factor V, sustituyendo una Arg506 por una Gln y denominándose *factor V de Leiden* (*Bertina et al., 1994; Greengard et al., 1994; Voorberg et al., 1994*). La alta prevalencia de esta mutación en la población general, entre un 2-5% (*Reis et al., 1995; Zivelin et al., 1997*), la convierte en una buena candidata como posible factor de riesgo trombótico adicional en las familias portadoras de deficiencias de PC o de PS, y los estudios posteriores así lo demuestran, ya que los pacientes portadores del FVL en combinación con alguna de estas deficiencias muestran un riesgo más elevado de sufrir accidentes trombóticos que los portadores de una sola de las deficiencias (*Koeleman et al., 1994; Zöller et al., 1995*). Aproximadamente al mismo tiempo fue reconocida la hiperhomocisteinemia como un factor de riesgo para la trombosis venosa (*Bienvenu et al., 1993*). Con posterioridad es identificada por Poort una mutación de la región 3' no transcrita de protrombina asociada a una forma familiar de tromboembolismo venoso (*Poort et al., 1996*). Con la inminente caracterización de un gran número de genes humanos se pueden anticipar grandes avances en la identificación de más trastornos genéticos asociados a trombofilia hereditaria.

Se pueden identificar trombofilias hereditarias en un 30% a un 50% de los pacientes que presentan el primer episodio de trombosis venosa o tromboembolismo pulmonar, con altos porcentajes de trombofilia en enfermos con episodios recurrentes de trombosis. Pacientes con trombofilia hereditaria pueden tener una o más alteraciones asociadas, como anticuerpos antifosfolípido, enfermedades malignas, enfermedades mieloproliferativas, o

trastornos inflamatorios. Los estados trombóticos hereditarios se asocian más con trombosis venosas que arteriales; de cualquier forma, la asociación con otros factores de riesgo como el tabaco o la diabetes, tal como se sugiere en publicaciones recientes, ocasiona que puede encontrarse trombosis arterial hasta en un 10% de enfermos con trombofilia hereditaria (*Zoller et al., 1998*).

Las **características de las trombofilias congénitas** son:

- Trombosis venosa (> 90% de los casos). Es posible la trombosis arterial.
- Frecuente aparición a edades tempranas (< 45 años).
- Episodios de repetición (> 50%).
- Historia familiar de trombosis.
- Localizaciones inusuales de las trombosis (por ejemplo, mesentérica).
- Intensidad desproporcionada al estímulo.

Otras condiciones asociadas con trombofilias familiares son:

- Necrosis cutáneas asociadas a anticoagulantes orales.
- *Púrpura fulminans* (neonatos).
- Pérdidas fetales recurrentes (por trombosis de la placenta).

I.2.3. Bases moleculares de la trombofilia hereditaria.

I.2.3.1. Deficiencia de antitrombina.

La AT (denominada también antitrombina III) es una proteína plasmática que se sintetiza en el hígado y que pertenece a la familia de los inhibidores de serinproteasas. Neutraliza a la trombina de forma irreversible formando complejos 1:1. La intensidad de la inhibición de la trombina es catalizada por la heparina. El gen que codifica para la AT está localizado en el cromosoma 1 entre las bandas 1q23 y 1q25 (*Bock et al., 1985*), tiene 13,5 kilobases de longitud y consta de siete exones (*Bock et al., 1988*).

La primera familia descrita con una deficiencia hereditaria de antitrombina y trombosis fue publicada por Egeberg en 1965 siguiendo un patrón de herencia autosómica dominante. Desde entonces se han descrito numerosas familias y se dispone de una base de datos con más de 250 mutaciones en el gen de la antitrombina (*Lane et al., 1997*). La deficiencia de antitrombina III de tipo I se define por niveles bajos de antígeno y actividades en ausencia o presencia de heparina. El tipo II se define por la presencia de moléculas disfuncionales en plasma con niveles normales de antígeno; afecta al centro activo de inhibidores, actuando en el receptor del enzima activador o en el receptor del inhibidor de la heparina e incrementando la actividad de la acción de antitrombina III. La deficiencia grave de antitrombina (menos del 5%) es muy poco frecuente. Afecta a la potenciación del efecto de la antitrombina por la heparina y se asocia con trombosis arteriales graves.

La deficiencia de antitrombina III se encuentra aproximadamente en el 1% de los pacientes estudiados con su primera trombosis venosa documentada por debajo de los 70 años. (*Martinelli et al., 1998; Bucciarelli et al., 1999; Rosendaal FR., 1999*). En población española se observó como resultado del estudio EMET (Estudio Multicéntrico Español de Trombofilia) que en pacientes con trombosis venosa la prevalencia era de un 0,47% (*Mateo et al., 1997*). Se ha estimado que la deficiencia de AT está asociada a un incremento de entre 10 y 20 veces el riesgo trombótico (*Lane et al., 1996*).

I.2.3.2. Deficiencia de proteína C.

La proteína C se sintetiza en el hígado y circula en el plasma como una serinproteasa activándose con una proteólisis por la unión de trombina y trombomodulina. El gen para la proteína C humana está en el cromosoma 2q13-14 y está compuesto por nueve exones y ocho intrones correspondiendo el primer exón a la región no codificadora del extremo 5'. (*Plutzky et al., 1986*).

La proteína C activada (PCA) es una potente enzima anticoagulante que, formando un complejo con su cofactor, la proteína S, actúa en las vías de la coagulación por la acción proteolítica irreversible de inactivación de los factores Va y VIIIa. Por tanto, la disminución de los niveles del quimógeno de la proteína C contribuye a la hipercoagulabilidad.

Los primeros casos de deficiencia heterocigótica familiar de proteína C (aproximadamente el 50% del nivel) se asocian con trombosis venosa en jóvenes adultos (*Griffin et al., 1981*), aunque también se han descrito casos de trombosis arterial asociados a bajos niveles de proteína C en recién nacidos (*Tridapalli et al., 2010*) y la deficiencia grave de proteína C (menos del 1% de su actividad) se asocia a púrpura neonatal fulminante (*Branson et al., 1983*). Los déficit hereditarios de proteína C más típicos son las formas autosómicas en las cuales el paciente tiene un 50% del nivel normal funcionante de proteína C en plasma. Se han publicado más de 150 formas de mutaciones diferentes en el gen de la proteína C que se asocian con trombosis. (*Reitsma PH et al., 1995*). La prevalencia en nuestro medio en pacientes con trombosis venosa se estimó de un 3,19% en el Estudio EMET. (*Mateo et al., 1997*). Además se ha descrito que incrementa el riesgo de trombosis hasta 10 veces. (*Aiach et al., 1997*). La forma heterocigótica de la deficiencia de la proteína C se asocia con un riesgo medio de trombosis. El déficit de proteína C de tipo I se define como un desorden con reducción paralela en plasma de la actividad anticoagulante y de los niveles plasmáticos de proteína, mientras que el tipo II tiene unos niveles plasmáticos normales, pero las moléculas son disfuncionantes, con bajos niveles de actividad anticoagulante.

I.2.3.3. Deficiencia de proteína S.

La proteína S es una glucoproteína plasmática de cadena única sintetizada principalmente por los hepatocitos pero también por las células endoteliales, megacariocitos, células de Leydig y osteoblastos sirviendo como cofactor para la escisión e inactivación de los factores Va y VIIIa por la proteína C activada. En contraste con los factores V y VIII no requiere la activación proteolítica para su actividad como cofactor. La proteína S (PS) en solitario también tiene una baja actividad como anticoagulante en virtud de su capacidad para competir con el factor Xa en la unión con el factor Va. En sangre, un 40% de la PS circula en forma libre y un 60% formando un complejo estequiométrico 1:1 con el C4b. La proteína S que funciona como cofactor de la proteína C activada debe estar en la forma libre. Mientras que la proteína de unión al C4b es un reactante de fase aguda, su subunidad alfa, que se une a la proteína S, no aumenta en los procesos inflamatorios; por tanto, la concentración de proteína S libre no se ve afectada por la respuesta de fase aguda. El gen humano de la PS está en el cromosoma 3, extendiéndose el centrómero desde el p11.1 hasta el q11.2 y consta de 15 exones y 14 intrones. (*Edenbrandt., 1990*).

La primera familia con deficiencia hereditaria en PS asociada a la enfermedad tromboembólica fue publicada por Schwarz en 1984 (*Schwarz et al., 1984*). Desde entonces se han descrito numerosos trastornos familiares con esta deficiencia (*Bolan et al., 1993; Simmonds et al., 1998*). Recientemente se han relacionado niveles altos de Factor VIII y niveles bajos de proteína S libre con un riesgo moderado de padecer trombosis arterial. (*Mulder et al., 2010*). La prevalencia de deficiencia en PS en pacientes con historia trombótica ha sido estimada entre el 0,5-8% (*Lane et al., 1996*). En el estudio EMET, realizado en población española, observamos una prevalencia de la deficiencia de PS en pacientes con trombosis venosa del 7,27% (*Mateo et al., 1997*) y en el estudio

familiar, a partir de este estudio EMET, observamos que los pacientes con deficiencia de PS tipo III tenían 8,1 veces más riesgo de padecer trombosis venosa que los individuos normales (*Mateo et al., 1998*).

El riesgo de episodios trombóticos en pacientes con edad joven y con déficit de PS es inferior al de la deficiencia de AT, igualándose en edad avanzada (*Rosendaal., 1999*). Las manifestaciones clínicas son parecidas a las que se producen en las deficiencias de PC y AT, aunque la presencia de trombosis arterial y cerebral son más frecuentes (*Allart et al., 1990; Coller et al., 1987*). Sólo se han descrito unos pocos casos de deficiencia en homocigosis, y se han asociado a una enfermedad trombótica severa y a *purpura fulminans* neonatal (*Mahasandana et al., 1990*). Esta *purpura fulminans* también ha sido descrita como una complicación de infección por varicela en la que se generaron autoanticuerpos dirigidos contra la proteína S. La falta de proteína S ocasionó coagulación intravascular diseminada, trombosis e isquemia. (*Jordan et al., 2010*).

La deficiencia de proteína S de tipo I se caracteriza por una disminución paralela de los niveles de antígeno y de actividad anticoagulante en plasma (los niveles de PS total, de PS libre y PS funcional están disminuidos), mientras que el tipo II cursa con niveles normales en plasma de moléculas disfuncionantes que se asocian a una disminución de la actividad anticoagulante (niveles normales de PS total y PS libre y niveles de PS funcional disminuidos). En la deficiencia de tipo III el nivel total de proteína S libre es bajo y el nivel del antígeno y de PS total es normal.

I.2.3.4. Resistencia a la proteína C activada.

El término resistencia a la proteína C activada (PCA) define una capacidad disminuida de la acción anticoagulante del sistema de la proteína C en el plasma. En 1989 fue descrita una respuesta anormalmente pobre a la PCA

en enfermos con trombosis venosas cuando se había demostrado que unas fracciones purificadas de anticuerpos interferían en la expresión de la actividad de la PCA. (Malia *et al.*, 1989; Amer *et al.*, 1990) pero no fue hasta 1993 cuando Dahlback describió tres familias no relacionadas que presentaban trombosis venosas con resistencia a la PCA estimulando la investigación de diferentes explicaciones genéticas y moleculares.

La resistencia a la PCA puede estar causada por defectos moleculares heterogéneos aunque el reemplazo de una Arg506 por Gln en el factor V, mutación conocida como factor V de Leiden (FVL) es la responsable de la resistencia a la PCA al menos en el 90% de los casos. La resistencia a la PCA es la alteración fenotípica de laboratorio, mientras que el factor V GLN506 es el genotipo y el término resistencia a la PCA no debería emplearse como sinónimo de *factor V de Leiden*. La resistencia a la PCA producida por defectos diferentes al factor V de Leiden se asocia con riesgo de trombosis venosas (De Visser *et al.*, 1999) o accidentes isquémicos cerebrovasculares (Van der Bom *et al.*, 1996).

I.2.3.4.1. Factor V Arg506Gln (Factor V de Leiden).

El factor V (FV) es una gran glucoproteína con un Mi de aproximadamente 330.000 y una vida media plasmática de unas 12 horas que se sintetiza en el hígado y los megacariocitos. El gen del FV está localizado en el cromosoma 1q21-q25, tiene un tamaño de aproximadamente 70 Kb y está constituido por 25 exones.

Tiene la siguiente organización de dominios: A1-A2-B-A3-C1-C2 coincidente con la del factor VIII y, a diferencia de este, determinadas secuencias en el dominio B son importantes para promover su activación por la trombina. Se cree que el FV se activa principalmente por la trombina *in vivo*, aunque puede activarse también por el factor Xa. La trombina fracciona el FV al

nivel de la Arg709 y la Arg1545, produciendo una molécula heterodimérica de dos cadenas formada por una cadena pesada A1-A2 (M_i 110.000) que está asociada con una cadena ligera (M_i 73.000). Las dos cadenas están unidas de forma no covalente mediante iones metal (calcio). El factor V activado es inactivado por el fraccionamiento de la proteína C activada en Arg306 y en Arg506, seguido de la disociación de los fragmentos A2 divididos. Un cambio común de Arg506 por Gln confiere resistencia a la proteína C activada ya que cuando la glutamina está presente la PCA no puede inactivar completamente al FVa asociándose con un mayor riesgo de tromboembolismo venoso. (*Bertina et al., 1994*). La inactivación del FV activado mediante la PCA y con la PS como cofactor de la reacción, es un paso importante de este sistema de inhibición de la coagulación.

En 1994, se identificó una mutación puntual en el gen del factor V como el defecto genético que causaba el fenotipo de la resistencia a la proteína C activada en la gran mayoría de las formas hereditarias (más del 90%). (*Bertina et al., 1994*). Se trata del reemplazo de una G por una A en el nucleótido 1691 en el exón 10 del gen del factor V, que provoca un cambio del aminoácido 506 de arginina (Arg) a glutamina (Gln). Esta mutación se conoce como Factor V Leiden (FVL) y se ha descrito en un individuo de origen caucasiano con una antigüedad de hace 21000 a 34000 años. (*Zivelin et al., 1997*). Este cambio en uno de los lugares de inactivación del FV activado produce una molécula de FVa que muestra una resistencia a la acción de la proteína C activada potenciando así la capacidad procoagulante del FV. Esta mutación es más común en caucásianos especialmente en aquellos que descienden de europeos occidentales y menos frecuente en la población general, siendo poco común en África y Asia. Aproximadamente el 5% de los europeos son portadores de esta mutación. (*Rees., 1996*). En Estados Unidos la presentan entre el 2 y el 5% de la población general y entre el 15 y el 20% de los pacientes

con tromboembolismo venoso. (Zoller *et al.*, 1994). En la bibliografía publicada el defecto se denomina *Gln506-factor V*, *Q506-factor V* o *factor V de Leiden*.

El riesgo de trombosis venosa en heterocigotos de FVL es siete veces mayor aumentando hasta 80 veces en homocigotos, sin embargo muchos de ellos nunca desarrollaran la trombosis excepto cuando se combina la mutación con otros factores de riesgo; por tanto las manifestaciones clínicas de trombofilia en pacientes con FVL dependen de los siguientes factores:

I. El número de alelos con FVL: en heterocigotos el riesgo de trombosis venosa se incrementa entre tres y ocho veces. (Juul *et al.* 2004; Heit *et al.* 2005). En individuos que son homocigotos el riesgo de incrementa entre 18 y 80 veces. Aunque los homocigotos presentan un elevado riesgo de desarrollar trombosis en edades tempranas este riesgo es mucho mayor si se asocia con homocigotos para la deficiencia de proteína C o S. (Kujovich., 2010).

II. Coexistencia con otras anomalías genéticas: La presencia de FVL junto con deficiencia de proteína C, proteína S y antitrombina hace que el riesgo trombótico sea superior al asociado a cada una de ellas por separado. (Ridker *et al.*, 1997). En individuos con doble heterocigosis para FVL y protrombina G20210>A el riesgo trombótico es veinte veces mayor mientras que en individuos en los que la heterocigosis es solo para FVL o protrombina en cuyo caso el riesgo de desarrollar trombosis solo es cinco veces superior al que presenta la población en general. (Emmerich *et al.*, 2001). En familias con defectos combinados las trombosis son más frecuentes y aparecen en edades más tempranas.

III. Historia familiar: Un reciente estudio ha señalado que individuos con FVL y con historia familiar de trombosis tienen un riesgo tres veces superior de desarrollar tromboembolismo venoso que pacientes con FVL e historia familiar negativa. (Bezemer *et al.*, 2009).

IV. Otros factores: En pacientes con hiperhomocisteinemia y FVL el riesgo de desarrollar trombosis es 22 veces mayor. (Ridker *et al.*, 1997).

También se ha descrito que pacientes con FVL heterocigotos y niveles elevados de Factor VIII tienen tres veces más incidencia de tromboembolismo venoso (TEV) que pacientes con FVL únicamente. (*Lensen et al., 2001*). Igualmente diversos estudios han asociado que personas con cáncer y FVL tienen un riesgo incrementado de TEV. (*Blom et al., 2005; Talamo et al., 2009*). Otros estudios han examinado el riesgo de tromboembolismo en mujeres con factor V de Leiden que toman anticonceptivos orales (estrógenos). Hay un incremento significativo de 30 a 80 veces en el riesgo de presentar trombosis, con un incremento del riesgo absoluto del 0.8 al 28.25 por cada 10.000 mujeres y año. (*Bloemenkamp et al., 1995; Laczkovics et al., 2007*).

V. Embarazo: La presencia de FVL se ha asociado con un riesgo entre 5 y 52 veces superior de padecer un episodio trombótico durante el embarazo y el puerperio si se compara con mujeres no embarazadas con trombofilia. (*Kujovich., 2010*).

I.2.3.4.2. Otras mutaciones en el gen del Factor V.

La resistencia a la proteína C activada está causada, como se ha dicho, en la mayoría de los casos por una mutación en el gen del factor V conocida con el nombre de factor V de Leiden (Arg506Gln) pero hay otras mutaciones en el gen del factor V que pueden contribuir a la trombosis hereditaria en la resistencia a la PCA y que representan aproximadamente el 5% de los pacientes con resistencia a la PCA. (*Tosetto et al., 2004*).

1. Mutaciones en Arg306 (FV *Cambridge* y FV *Hong Kong*). Se han descrito dos mutaciones diferentes que afectan a Arg306 en el sitio de escisión del FVa: En FV *Cambridge* se cambia Arg306 por Thr (G1091C) y fue identificado en pacientes con resistencia a la PCA y trombosis. (*Williamson et al., 1998; Le Cam-Duchez et al., 2006*). En FV *Hong Kong* se reemplaza Arg306 por Gly (A1090G) y presenta una

- prevalencia del 4.5% en la población china de Hong Kong. (*Chan et al.*, 1998).
2. FV Ile359 Thr (FV*Liverpool*). Esta mutación fue identificada en dos hermanos que tenían severas manifestaciones trombóticas desde antes de los veinte años. (*Munford et al.*, 2003).
 3. G2172C. Una nueva mutación (G2172C) se asoció con resistencia a la PCA en una familia china con tromboembolismo venoso. Esta mutación parece interferir con el sitio de escisión de la Arg679 en la PCA. (*Cai et al.*, 2010).
 4. FV R2. En un estudio donde se analizaron polimorfismos para el gen del FV se describió un haplotipo denominado HR2 formado por 6 polimorfismos en el exón 13 del gen F5 y una variación en la secuencia del exón 16 que podrían estar implicados en una reducción de los niveles de FV y de resistencia a la PCA. (*Lungui et al.*, 1996; *Bernardi et al.*, 1997).

I.2.3.5. Mutación PTG20210A.

La protrombina o Factor II es una proteína vitamina K dependiente que se sintetiza fundamentalmente en el hígado. Circula como un zimógeno de cadena única con un Mi de aproximadamente 72000 y una vida media plasmática de aproximadamente 60 horas. El gen humano de la protrombina se ha localizado en el cromosoma 11, cerca del centrómero y está compuesto por 14 exones separados por 13 intrones. La protrombina es dividida por el complejo factor Va/Xa en dos sitios (Arg 271 y Arg320) liberándose el dominio catalítico (trombina) que elimina a los fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno y forma los monómeros de fibrina.

En 1996 *Poort* y colaboradores publicaron un polimorfismo en la región 3' del gen de la protrombina llamada nt G20210A. El cambio de G por A

en la posición 20210 daba como resultado un incremento de los niveles circulantes de protrombina y en consecuencia un aumento de trombina que se asociaba con un incremento del riesgo de trombosis venosa. Es el segundo defecto más común, tras el Factor V de Leiden, en la trombofilia hereditaria. El polimorfismo surge en un antecesor de origen caucásico y se encuentra entre un 1 y un 5% de las personas de esta raza. (Poort *et al.*, 1996). En Europa la prevalencia es mayor en los países del sur (3%) que en los del norte (1.7%) siendo extremadamente rara en África y Asia. Entre los pacientes con tromboembolismo venoso la frecuencia alcanza entre el 6 y el 18% y el riesgo de padecer episodios trombóticos se incrementa entre dos y cinco veces. (Rosendaal *et al.*, 1998).

Las manifestaciones clínicas de esta mutación son variables, muchos individuos que son homocigotos o heterocigotos para la mutación G20210A nunca desarrollarán trombosis. Otros heterocigotos no tendrán complicaciones hasta bien entrada la edad adulta mientras que por el contrario algunos pacientes tendrán trombosis recurrentes antes de los treinta años.

La principal manifestación clínica de la mutación Protrombina G20210A es el tromboembolismo venoso y dentro de este la más común es la trombosis venosa profunda sobretodo localizada en las piernas. Algunos estudios refieren un riesgo en heterocigotos PT G20210A de tres a cinco veces mayor de presentar trombosis en las extremidades. (Martinelli *et al.*, 2004). También se han descrito casos de trombosis venosas superficiales en pacientes con PT G20210A, en los cuales el riesgo de sufrir estos episodios es de casi cuatro veces superior al normal. (Martinelli *et al.*, 1999). Igualmente aparecen algunos casos de trombosis en localizaciones inusuales en pacientes con PT G20210A pero con menos frecuencia; destaca la trombosis venosa cerebral que en pacientes heterocigotos tiene un riesgo entre seis y diez veces mayor. (Martinelli *et al.*, 1998).

La mutación PT G20210A incrementa el riesgo de pérdida del feto y de otras complicaciones en mujeres embarazadas con trombofilia. Algunos estudios sugieren que esta mutación en adición con el mayor riesgo de padecer episodios tromboembólicos en embarazadas incrementa el riesgo de perder el feto. La mutación G20210A en heterocigosis fue encontrada entre un 4 y un 13% de mujeres con pérdidas del feto, fundamentalmente en el primer trimestre. (*Raziel et al, 2001; Many et al., 2002*).

La expresión clínica de la trombofilia por mutación de la protrombina se ve afectada por cuatro factores:

1. El número de alelos con G20210A: el riesgo de padecer trombofilia es mayor en homocigotos que en heterocigotos, siendo en estos últimos entre dos y cuatro veces mayor (*Poort et al., 1998*), mientras que en homocigotos no ha sido cuantificado.
2. Coexistencia con otras anomalías genéticas: Entre un 8 y un 14% de los G20210A heterocigotos llevan asociados otros factores de trombofilia hereditaria. En estos casos las trombosis suelen aparecer a edades más tempranas y el riesgo de trombosis recurrentes es mayor que en el caso de que sólo hubiera un defecto genético. (*Makris et al., 1997*).
 - Factor V de Leiden. La mutación G20210A heterocigota ha sido encontrada entre el 6 y el 12% de los pacientes con FV de Leiden con historia de ETV. (*Tirado et al., 2001*). Se ha estimado un riesgo relativo entre 20 y 60 veces mayor de desarrollar trombosis venosa en individuos doble heterocigotos para PT G20210A y FVL. (*Emmerich et al., 2001*).
 - Deficiencia de Proteína S. En un estudio realizado a familias con trombofilia la combinación de la deficiencia de Proteína S y G20210A se asoció con casi trece veces más riesgo de padecer ETV comparado con el riesgo cuatro veces incrementado en el caso de sólo G20210A. (*Tirado et al., 2001*).

3. Coexistencia con desordenes trombofílicos adquiridos. Se ha descrito que elevadas concentraciones ($>12 \mu\text{mol/L}$) de homocisteína en plasma (*hiperhomocisteinemia*) y G20210A heterocigota confieren un riesgo entre 3.8 y 2.5 veces mayor de padecer ETV. (*De Stefano et al., 2001*).
4. Otros factores de riesgo. Al menos el 50% de los episodios trombóticos en individuos con mutación de la protrombina son provocados por la conjunción con otros factores de riesgo, siendo el embarazo el más común. (*Gerhardt et al., 2000*). En este sentido diversos estudios confirmaron que mujeres con G20210A heterocigotas tienen entre 3 y 15 veces más riesgo de sufrir un embarazo asociado a ETV que mujeres sin la mutación G20210A. (*Martinelli et al., 2002; Meglic et al., 2003*). Por otro lado la combinación de G20210A y anticonceptivos orales incrementa entre 16 y 59 veces el riesgo de padecer ETV. (*Martinelli et al., 1999; Legnani et al., 2002*).

I.2.3.6. Polimorfismo en el gen del Factor XIII.

El factor XIII es una proteína con actividad transglutaminasa presente en el plasma. Las transglutaminasas son enzimas que catalizan el entrecruzamiento de otras proteínas modificando sus propiedades. También se las denomina “factor estabilizante de la fibrina”, ya que su función principal es establecer puentes ϵ -(γ -glutamil)-lisina mediante enlaces covalentes en el polímero de fibrina soluble originando una estructura tridimensional más estable y resistente a la fibrinólisis.

Un aspecto controvertido acerca del factor XIII es la influencia que los polimorfismos genéticos del mismo podrían tener en la incidencia de complicaciones trombóticas (ETV, infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular) o de hemorragia intracraneal espontánea.

El polimorfismo analizado en más estudios es el Val34Leu, que afecta a un 25% de la población caucásica, siendo más raro en otros grupos étnicos. Afecta al péptido de activación y en las variantes con Leu la escisión del mismo por la trombina ocurre hasta 2,5 veces más rápido; sin embargo, los niveles de actividad funcional del factor XIII en plasma son similares. (*Bereczky et al., 2004*). A esta variante alélica se le adjudicó en algunos trabajos preliminares una cierta “capacidad protectora” frente a eventos trombóticos, tanto venosos como arteriales, pero existe gran controversia sobre este tema en la bibliografía. (*Balogh et al., 2000*). En los últimos años se han publicado dos metaanálisis independientes que evalúan el efecto de este polimorfismo sobre la incidencia de patología trombótica coronaria. (*Bokó et al., 2007; Shafey et al., 2007*). En ambos casos se demuestra un descenso muy leve (15-20%; *odds ratios*: 0,79-0,81; 0,82-0,89) para los individuos con variantes Leu34 (heterocigotos u homocigotos) respecto a la variante con Val34 homocigota. El mismo discreto efecto protector se ha encontrado sobre la aparición de enfermedad tromboembólica venosa en otro metaanálisis. (*Wells et al., 2006*). (*Odds ratios*: 0,89-0,85). En cualquier caso, ninguno de los estudios parece justificar la necesidad de analizar este polimorfismo dentro de los estudios de trombofilia hereditaria.

I.2.3.7. Mutación C46T en el gen del factor XII.

El factor XII es una serín-proteasa del sistema de contacto que desempeña un papel en los sistemas de coagulación y fibrinólisis. La función del factor XII es controvertida, ya que si bien su deficiencia causa un alargamiento asintomático del APTT, en pacientes con deficiencia se han comunicado problemas trombóticos. Debido a que el polimorfismo C46T en el gen del factor XII influye en los niveles plasmáticos del factor XII se ha estudiado su papel en pacientes con trombosis venosas. El estudio GAIT

(Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia) demostró que la mutación C46T incrementa el riesgo de trombosis teniendo especial importancia en España, pues la mutación afecta al 17 por ciento de su población y a un 23 por ciento de los pacientes con trombosis. Concretamente, los portadores homocigotos del alelo T tienen 5 veces más riesgo de eventos tromboembólicos que los no portadores. (*Reuner et al., 2008*).

Recientemente, en la misma dirección, se ha publicado un estudio que muestra la implicación de este polimorfismo como factor de riesgo trombótico durante el primer trimestre del embarazo en un seguimiento de 32.463 mujeres previamente asintomáticas. (*Cochery-Nouvellon et al., 2007*).

I.2.3.8. Grupo sanguíneo ABO.

Los grupos sanguíneos del sistema ABO se han relacionado con el riesgo cardiovascular desde hace más de 20 años. Se había relacionado este incremento de riesgo con el incremento de factor VIII y factor Von Willebrand. En recientes estudios se ha observado que los individuos con grupos sanguíneos no-O presentan un aumento de riesgo de trombosis de 2.6 veces respecto al grupo O. Probablemente sea el alelo A₁ el responsable de este incremento de riesgo. (*Tirado et al., 2005*). Este riesgo incrementado es independiente de los niveles de factor VIII y de factor Von Willebrand.

I.2.3.9. Niveles elevados de factores de la coagulación.

I.2.3.9.1. Incremento de los niveles del Factor VIII.

El factor VIII es un importante cofactor en la activación del factor X. Su deficiencia produce hemofilia A, una grave enfermedad hemorrágica. Los niveles elevados de factor VIII se han asociado con el incremento del riesgo de

trombosis venosa. (*Koster et al., 1995; Tirado et al., 2005*). Los pacientes con niveles de factor VIII por encima del percentil 90 de la población normal muestran un incremento del riesgo de trombosis entre 3-5 veces. También el riesgo de recurrencias está incrementado en pacientes con niveles elevados de factor VIII. (*Tirado et al., 2005; Kyrle et al., 2000*). Los niveles de factor VIII suelen ser estables en el tiempo y hoy en día se acepta que puede subyacer una base genética disponiendo de datos científicos que avalan la presencia de un gen en el cromosoma 5 que podría estar implicado en la determinación de los niveles de factor VIII. (*Berger et al., 2005*). En algunos pacientes pueden aumentar de manera adquirida debido a diversas causas (enfermedades inflamatorias, hepatopatías, embarazo). Se ha descrito que pacientes con niveles elevados de factor VIII tienen un mayor riesgo de desarrollar trombosis venosa tras viajes de larga distancia que pacientes con niveles normales. (OR, 6.2; 95% IC 3.6-10.5). (*Kuipers et al., 2009*).

I.2.3.9.2. Incremento de los niveles de Factor IX y Factor XI.

También se ha descrito que niveles altos tanto de FXI como de Factor IX (ambos por encima del percentil 90) se asocian a un incremento de riesgo trombotico de 2.2 y unas 2-3 veces respectivamente. (*Meijers et al., 2000; van Hylckama et al., 2000*). (Tabla 3). Al igual que ocurre con el factor VIII se han relacionado niveles elevados de factor IX y de fibrinógeno con un mayor riesgo de desarrollar trombosis tras viajes de larga distancia respecto a individuos con valores normales (OR, 3.2; 95% IC 0.9-11) para el factor IX y (OR, 2.0; 95% IC 0.7-5.5) para el fibrinógeno. (*Kuipers et al., 2009*).

I.2.3.9.3. Incremento de los niveles de Fibrinógeno.

El fibrinógeno ha aparecido en varios estudios sobre enfermedad isquémica como un predictor independiente de riesgo de trombosis. En este sentido se ha descrito que concentraciones de fibrinógeno elevadas se asocian con un incremento del riesgo trombótico. (Rosendaal., 1999). El fibrinógeno es un reactante de fase aguda, y como tal sus niveles plasmáticos pueden aumentar como parte de la reacción inflamatoria, además de que pueden modificarse por factores externos tales como el alcohol, el estrés, el tabaco, etc. Sin embargo, parecen existir también factores hereditarios, con variaciones genéticas asociadas a polimorfismos de las cadenas alfa y beta. Entre un 5-9% de la variabilidad de las concentraciones se explica por polimorfismos localizados en el gen de la cadena beta y sólo un 4.2% está determinado por polimorfismos en el gen de la cadena alfa. (Humphries et al., 1987). Estos resultados implican que otros factores genéticos son la causa de la mayor parte de la variación cuantitativa de este fenotipo. Hace unos años se localizaron dos regiones del genoma relacionadas con la concentración plasmática de fibrinógeno, una en el cromosoma 12 y otra en el 14. (Soria et al., 2005). El genotipo h1h2 produce niveles de fibrinógeno más elevados que el h1h1.

I.2.3.10. Hiperhomocisteinemia.

La hiperhomocisteinemia se define por la presencia de unos niveles elevados de homocisteína en plasma. La hiperhomocisteinemia grave, también llamada homocistinuria, es un trastorno autosómico recesivo que se caracteriza por un defecto grave de la cistationina β -sintetasa, 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) o de otras enzimas que intervienen en el metabolismo de la homocisteína. Un metaanálisis con 10 estudios de casos control concluyen que

la hiperhomocisteinemia se asocia con un riesgo incrementado de trombosis venosa. (*Den Heijer et al., 1998*).

La homocisteína es un intermediario en el metabolismo de los aminoácidos que contienen azufre, metionina y cisteína participando en diferentes vías metabólicas.

La causa más común de hiperhomocisteinemia grave es una cistationina β -sintetasa defectuosa. Se ha demostrado que los niveles elevados de homocisteína pueden deberse a causas adquiridas como niveles por debajo de lo normal de folato y vitaminas B₆ y B₁₂ o fallo renal en cuyo caso la administración de folato con vitaminas B₆ y B₁₂ puede reducir los niveles de homocisteína. (*Den Heijer et al., 1998*) pero también se han identificado factores genéticos causantes de la hiperhomocisteinemia. La causa genética mejor conocida de hiperhomocisteinemia afecta al gen MTHFR con un polimorfismo C677T que produce un reemplazo de Ala222 por Val dando lugar a una variante de la enzima que tiene menor actividad y que ve incrementada su sensibilidad a la inactivación por calor (termolabilidad). Se conoce que el 73% de los individuos con niveles de homocisteína superiores a 40 micromol/litro son homocigotos para la mutación C677T MTHFR. (*Guttomsem et al., 1996*). En homocigosis esta mutación provoca una variante termolábil de la enzima MTHFR que presenta una actividad residual del 50 % en su función de transferencia de grupos metilo en la vía de la remetilación de la homocisteína. Puesto que esta enzima usa como cofactor ácido fólico, la actividad enzimática se ve drásticamente reducida en situaciones carenciales de folatos. La forma homocigótica TT 677 se asocia con una hiperhomocisteinemia moderada y es considerada como un factor de riesgo de la ETV.

La hiperhomocisteinemia se asocia con frecuencia a ETV, además de, enfermedad arterial. Entre el 10% y el 25% de los pacientes con trombosis venosa recurrente tienen niveles plasmáticos de homocisteína que se encuentran por encima del percentil 95 con respecto a la distribución normal de la

población (p.ej. superiores a 17-22 $\mu\text{mol/litro}$). (D'Angelo et al, 1997; Eichinger et al., 1998). En diferentes metaanálisis se ha demostrado que el riesgo de presentar trombosis venosa si las concentraciones de homocisteína son altas es de 2.5 a 3. (Den Heijer et al., 1998). Sin embargo, existe controversia ya que otros autores afirman que en las formas homocigóticas de este defecto enzimático (que ocurre en el 10% al 20% de los individuos normales) en ausencia de otros factores de riesgo trombótico no se produce un incremento del riesgo de tromboembolismo. (Salomon et al., 1999; Bezemer et al., 2007). Los pacientes que son homocigóticos para el gen de la MTHFR y que tienen también el factor V de Leiden o mutación en el gen de la protrombina presentan un incremento del riesgo de trombosis. (Salomon et al., 1999). En heterocigotos la presencia de esta mutación no aumenta el riesgo de TVP, ni tan siquiera en los pacientes con factor V Leiden o mutación del gen de la protrombina. (Brown et al., 1998).

La asociación de hiperhomocisteinemia y trombosis venosa es muy fuerte en mujeres (p.ej., OR de 7) y también se incrementa con la edad encontrándose OR de 5.5 en pacientes con edades superiores a 50 años. (Den Heijer et al., 1996).

I.2.3.11. Disfibrinogenemia.

La disfibrinogenemia hereditaria se caracteriza por la biosíntesis de una molécula de fibrinógeno estructuralmente anormal que exhibe propiedades funcionales alteradas. Más de 260 casos de disfibrinogenemia congénita fueron descritos en 1994 sobrepasando ampliamente los 300 en la actualidad. Aproximadamente un 25% de los casos descritos de disfibrinogenemia han tenido historia de sangrado y en cerca de in 20% de las familias ha habido una tendencia a la trombosis (trombofilia). (Ebert., 1994). El resto son asintomáticos en estos aspectos. En algunas familias con disfibrinogenemia hay

patología orgánica asociada con el fibrinógeno como amiloidosis o enfermedad hepática de depósito. Además, en las mujeres con esta anomalía se incrementa el riesgo de trombosis postparto y de aborto.

Para la hemostasia normal la fibrina se forma después de la liberación de fibrinopéptidos a partir del fibrinógeno, debido a la proteólisis por la trombina y a la posterior polimerización en monómeros de fibrina. La fibrina se estabiliza por enlaces covalentes introducidos por el factor XII activado (XIIa). Es esencial durante la cicatrización la limitación y eliminación del trombo mediante la acción de una proteólisis mediada por la plasmina. Los defectos del fibrinógeno que producen una fibrinólisis anormal pueden producir trombosis debido a una falta de aclaramiento de la fibrina o a una no limitación del crecimiento del coágulo.

Dos mecanismos pueden explicar la trombosis como consecuencia del mal funcionamiento del fibrinógeno:

- Una unión defectuosa entre la trombina y la fibrina anormal que da lugar a un incremento de los niveles de trombina.
- Una incapacidad de esta fibrina anormal para ejercer un efecto estimulante sobre el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y ocasionando, por tanto, una disminución en la fibrinólisis.

Los pacientes con disfibrinogenemia hereditaria generalmente presentan trombosis venosas en edades tempranas (p.ej; de los 27 a los 32 años). También se ha apreciado un aumento en la frecuencia de abortos. (*Haverkate et al., 1995*)

I.2.3.12. Otros factores genéticos de riesgo trombótico.

Otros factores de la coagulación o del sistema fibrinolítico pueden estar implicados en la predisposición a la trombosis. (*Soria., 2009*)

Desde el punto de vista genético, son muchos los polimorfismos en diferentes genes candidatos que están siendo sometidos a múltiples estudios de asociación para determinar su implicación en la enfermedad tromboembólica. Destacaríamos diversos polimorfismos en el gen del receptor endotelial de la PC (EPCR) (Medina et al., 2005; Saposnik et al., 2004), polimorfismos en los genes que codifican para receptores plaquetarios (Corral et al., 1999., 2001) y polimorfismos en el gen que codifica el TAFI, que a través de la determinación de la concentración plasmática de TAFI podrían modular el riesgo de trombosis. (Franco et al., 2001). Sin embargo la auténtica contribución de estos polimorfismos en la ETV está por demostrar siendo incluso controvertida por la aparición de resultados contradictorios. (Franco et al., 2001.).

Estudios de ligamiento genético en un elevado número de familias han mostrado una fuerte correlación genética entre la susceptibilidad a los acontecimientos tromboticos y varios fenotipos de la hemostasia. Concretamente, los niveles de FVIII, FIX, FXI, FXII, FvW, activador tisular del plasminógeno (t-PA), generación de trombina, FVII, folato sérico y homocisteína están determinados por genes que a su vez incrementan el riesgo de eventos tromboticos. (Souto et al., 2000). Más recientemente, también ha permitido la identificación de las mutaciones A384S en el gen de la SERPINAC1 (Corral et al., 2007), que codifica para la antitrombina, y la R67X en el gen SERPINC10, que codifica el inhibidor de la proteína Z (Corral et al. 2006), asociadas a un incremento del riesgo de padecer eventos tromboticos. En esta línea ciertas investigaciones sugieren el papel anticoagulante del inhibidor dependiente de la proteína Z. Recientemente se ha identificado un nuevo marcador genético que incrementa el riesgo de TVP, la mutación puntual en la posición 1277 de la región aminoterminal del inhibidor dependiente de la proteína Z (G1277A). (González Porras et al., 2008).

Dada la clara implicación de los niveles de los factores de la coagulación en el aumento de riesgo trombotico, la identificación de los

factores genéticos que determinan estos niveles constituye una de las grandes líneas de investigación en el campo de la enfermedad tromboembólica. (*Soria et al., 2005*). En la actualidad, gracias a los estudios integrales del genoma, disponemos de información sobre regiones del genoma que contienen genes que determinan la variabilidad de diversos componentes de la coagulación. (Tabla 2). Incluso en algunos casos se conoce qué gen y qué variantes alélicas del gen son la causa de esta variabilidad así como su posible implicación en la enfermedad tromboembólica. Sin embargo, en otros casos, aún queda un largo recorrido para identificar muchos de estos factores genéticos. (*Soria et al., 2005*). Por ello, el gran reto actual de los investigadores es la identificación de nuevos factores genéticos que contribuyan a la variación interindividual del riesgo trombótico.

Tabla 2. Resultados del análisis de todo el genoma basados en ligamiento genético (genome-wide linkage studies) en el ámbito de la enfermedad tromboembólica. (Soria JM., 2009)

Fenotipo	Cromosoma	Gen
F II-trombosis	11p11	F2
F XII-trombosis	5q35	F12
F XII	10p13	?
Proteína S libre	1q32	C4BP
APCR/VIII trombosis	18p11	?
Factor von Willebrand	9p34	ABO
Proteína C	16	NQO1
Fibrinógeno	12	TCF1
Fibrinógeno	14	?
Factor VII	13	F7
TFPI	2	TFPI
TAFI	13	CPB2
F VIII	5/11	?
Trombosis	10p12	?
Trombosis	18p11.2	?
Trombosis	11q23	?

?: Gen candidato desconocido.

Tabla 3. Prevalencia de las alteraciones de la coagulación asociadas a riesgo tromboembólico. (Soria JM. 2009)

Factor de riesgo	Población General, %	Pacientes con Trombofilia, %
Deficiencia de AT	0,02	1-3
Deficiencia de PS	0,1-0,5	3-5
Deficiencia de PC	0,03-0,13	0,5-8
Factor V de Leiden	1-15	10-50
G20210A	2-6	6-18
Altas concentraciones de FVIII ^a	11	25
Altas concentraciones de FIX ^b	3	7,5
Altas concentraciones de FXI ^c	10	19

^a 150 IU/dL.

^b > percentil 90.

^c > percentil 90.

I.2.4. Trombofilias adquiridas.

Se pueden definir como un estado de hipercoagulabilidad asociado con un incremento del riesgo trombótico. Existen diversas causas siendo la más común el Síndrome Antifosfolípido, también llamado Síndrome de Hughes. Entre las restantes causas se encuentran la Hiperhomocisteinemia adquirida que se debería a déficit de vitamina B₁₂, B₆, o ácido fólico; los Síndromes mieloproliferativos que se asocian con frecuencia a eventos trombóticos (principalmente Trombocitemia Esencial) y por último las neoplasias.

I.2.4.1. Síndrome antifosfolípido.

El síndrome de anticuerpos antifosfolípido (aPL) es un trastorno adquirido por el que se producen trombosis vasculares o abortos recurrentes en pacientes que presentan anticuerpos antifosfolípido o proteínas cofactores de receptores de fosfolípidos. La presencia de estos anticuerpos se detecta mediante inmunoanálisis empleando una fase sólida de fosfolípidos y cofactores proteínicos como desencadenantes, o análisis de coagulación que muestren la inhibición de las reacciones de la coagulación que dependen de los fosfolípidos, conocidas como fenómeno *anticoagulante lúpico* (LA). El síndrome fue descrito como una entidad distinta en 1985 como *síndrome anticardiolipina* (aCL) por Hughes y fue denominado posteriormente *síndrome antifosfolípido* (aPL). (Harris et al., 1987).

El trastorno se considera primario si no se asocia con otras enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico, y secundario si se asocia con otras entidades, no pareciendo haber diferencias entre las formas secundarias y primarias en la presentación y evolución de la trombosis. (Krnjic Barrie et al., 1997).

I.2.5. Trombofilia y embarazo.

La trombofilia es causa de pérdida del feto así como de otras complicaciones en el embarazo, las más frecuentes debidas a trombosis de la vasculatura placentaria. (Greer., 1999; Bates., 2010). Igualmente se pueden producir partos prematuros (Kosar et al., 2011). Además el síndrome de hipercoagulabilidad ha sido relacionado con la preeclampsia, el retraso del crecimiento fetal y el infarto placentario. (Grandone et al., 1999; Benedetto et al., 2010). La mayor parte de los estados trombofílicos hereditarios están relacionados con estos cuadros. El factor V de Leiden tiene una *Odds Ratio*

(OR) para muerte fetal de 2-3, la deficiencia de proteína C tiene una OR de 2,3, la deficiencia de proteína S de 3,3 y la deficiencia de antitrombina tiene una OR de 5,2. Si están combinados estos defectos la OR para muerte fetal se incrementa hasta un 14,3. (James., 2009; Preston et al., 1999). La Hiperhomocisteinemia se ha relacionado con *abruptio placentae*, infarto placentario y prematuridad; además la forma homocigótica del defecto MTHFR termolábil se ha asociado a complicaciones en el embarazo. (Brenner et al., 2007; De Bries et al., 1997).

Cuando ocurre alguna complicación en el embarazo, incluyendo prematuridad, preeclampsia, *abruptio placentae* y retraso del crecimiento fetal, el 52% de las mujeres estaban afectadas por trombofilia comparada con el 17% de las mujeres con embarazos normales. (Kupferminc et al., 1999). Se deben, por tanto, realizar estudios diagnósticos de trombofilia en todas las mujeres con complicaciones recurrentes en la segunda mitad del embarazo, especialmente si en futuros estudios se determinan los tratamientos (p. ej.; dosis bajas de heparina de bajo peso molecular o aspirina) que pueden ser eficaces. (Sibai., 1999).

I.2.6. Trombofilia y estrógenos: anticonceptivos orales y terapia hormonal sustitutiva.

Los anticonceptivos orales incrementan el riesgo de trombosis en mujeres con trombofilia hereditaria. (Pabinger et al., 1994; Veljkovic et al., 2010; Blanco-Molina et al., 2010). Por ejemplo la OR para padecer trombosis en mujeres con factor V de Leiden que emplean anticonceptivos de tercera generación se incrementa de 50 a 60 veces. (Kujovich., 2010). En números absolutos esto representa un incremento del riesgo de 1/12.500 por año sin factor V de Leiden a 1/400 con factor V de Leiden. El riesgo asociado con la ingesta de anticonceptivos orales es mayor en las mujeres que son

homocigóticas para el FVL. En estos casos el empleo de anticonceptivos hormonales se debe hacer con mucha prudencia. No se deben recomendar los anticonceptivos hormonales a mujeres que presentan deficiencia de antitrombina, proteína C y proteína S. (*Pabinger et al., 1994*).

La cuestión de cuando emplear terapia hormonal sustitutiva en mujeres con trombofilia hereditaria es un tema difícil. El riesgo relativo de trombosis venosa con terapia con estrógenos en mujeres con se multiplica por 2 o por 4 respecto a mujeres que no utilizan la terapia hormonal. (*Vandenbroucke JP., 1996. Rossouw et al., 2002*). En un estudio se determinó que las mujeres heterocigotas para factor V de Leiden con terapia hormonal sustitutiva tienen 14 veces más riesgo de trombosis que mujeres con la misma mutación que no emplean dicha terapia. (*Herrington et al., 2002*).

El empleo selectivo de antiestrógenos como el tamoxifeno o el raloxifeno incrementa el riesgo de trombosis venosa. (*Abramson et al., 2006; Barrett-Connor et al., 2006*). El riesgo de ETV en mujeres con factor V de Leiden que usan moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERMs) como el tamoxifeno es ligeramente más elevado que el que tienen mujeres que solo usan estos moduladores. (*Duggan et al., 2003; Abramson et al., 2006*).

I.3. DIAGNÓSTICO DE TROMBOFILIAS.

I.3.1. Pruebas en el Laboratorio General.

Los análisis moleculares en plasma se encuentran en la actualidad ampliamente disponibles para el diagnóstico de los estados de hipercoagulabilidad hereditaria más frecuentes. (Tabla 4). Más del 50% de los pacientes que presentan un primer episodio de trombosis venosa profunda (TVP) presentarán una prueba de laboratorio alterada que sugiera un defecto trombofílico. Los que presentan tromboembolismo recurrente o una historia

familiar de trombosis es más probable que presenten trombofilia, por ello se deben estudiar pacientes con historia de tromboembolismo y sus familiares en primer grado, ya que si estos fueran portadores deberían someterse a profilaxis tromboembólica en situaciones de riesgo como es una intervención quirúrgica o una inmovilización prolongada. Se les debe pedir en principio las siguientes pruebas:

Pruebas generales: Hemograma completo con frotis y reticulocitos, bioquímica sérica con función renal, hepática, LDH, orina y sedimento.

Pruebas de escrutinio: Tiempo de Protrombina (TP), Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), Tiempo de Trombina (TT), Fibrinógeno.

- Tiempo de Trombina: Permite la identificación de disfibrinogenemia y la contaminación con heparina.
- Tiempo de Protrombina: Es útil en la identificación de valores bajos de proteína C y proteína S.
- Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada: Identifica la presencia de anticoagulante lúpico aunque no es específico.

Pruebas que determinan el estado hipercoagulable: El Dímero D es un marcador de hipercoagulabilidad muy sensible pero poco específico. Al ser un producto de la degradación de la fibrina, se halla en la circulación sanguínea tras la lisis de la misma. Un resultado negativo del Dímero-D en pacientes con bajo riesgo de TVP (trombosis venosa profunda) permite descartar la trombosis sin necesidad de recurrir a otras técnicas.

Pruebas específicas: Una vez establecido el diagnóstico se debe realizar un estudio completo en busca de las causas que han provocado ese estado hipercoagulable. Se debe realizar en primer lugar el estudio de las magnitudes que se asocian con mayor frecuencia a la trombosis. El perfil tiene que comenzar con la determinación de la resistencia a la Proteína C activada (RPCa) seguido de determinación funcional de Antitrombina III, Proteína C, Proteína S,

Anticoagulante lúpico y anticuerpos anticardiolipinas IgG e IgM, homocisteína y plasminógeno. Asimismo es importante determinar la actividad del factor VIII y la concentración de fibrinógeno.

Si la homocisteína estuviera elevada debería realizarse el estudio genético de la MTHFR para determinar la mutación C677T.

Si la prueba de la resistencia a la proteína C activada resultase alterada, el siguiente paso sería la confirmación de la mutación del gen del factor V (factor V Leiden) por biología molecular.

En caso de hiperprotrombinemia debido a una mutación del gen de la protrombina, ésta debe determinarse por biología molecular.

Tabla 4. Principales pruebas de laboratorio para el diagnóstico de trombofilia hereditaria.

Pruebas de laboratorio para evaluar la trombofilia hereditaria	
Resistencia a la PCA	Actividad antitrombina
Factor V de Leiden	Actividad de la proteína C
Mutación del gen de la Protrombina G20210A	Actividad de la proteína S
Homocisteína en plasma	Fibrinógeno
Factor VIII	Tiempo de trombina diluido

I.3.2. Diagnóstico molecular de trombofilias.

Como se ha dicho, la trombofilia puede ser definida como un desorden en la coagulación que predispone hacia la trombosis. La trombofilia puede deberse a causas adquiridas o genéticas o inherentes. La identificación de las bases genéticas de estas causas inherentes de trombofilia marcó el comienzo de una nueva forma de pensar sobre la trombosis y sobre la importancia de sus componentes genéticos. (*League et al., 2005*). El interés por las bases genéticas de la enfermedad tromboembólica venosa (ETV) se aceleró con los descubrimientos del Factor V de Leiden, la Protrombina G20210A y la MTHFR C677T. Estos polimorfismos de un nucleótido (SNPs) (Single Nucleotide Polymorphisms) y otras variantes genéticas asociadas con la ETV se han convertido en partes fundamentales en el diagnóstico de la trombofilia hereditaria. Debido al gran volumen de pruebas genéticas existentes en la actualidad y anticipándose a las futuras pruebas genéticas existe un enorme empuje para desarrollar nuevos métodos de genotipado seguramente diferentes de los hasta ahora utilizados en el entorno clínico y de laboratorio. La identificación de nuevas variantes genéticas que puedan afectar directa o indirectamente a la coagulación o a la anticoagulación supondrá un gran avance para la comprensión y el manejo clínico de las trombofilias. (*League et al., 2005*).

Puede identificarse una predisposición genética entre un 60% y un 70% de los pacientes con ETV. (*Buchanan et al, 2003*). Existen trastornos autosómicos dominantes asociados a las deficiencias de proteína C, proteína S y antitrombina, pero también se han descrito numerosos trastornos autosómicos recesivos que afectan al factor VII, al fibrinógeno o a la trombomodulina. Sólo en el gen de la proteína C se han identificado más de 160 variaciones genéticas.

Sin embargo el cambio de un solo nucleótido (SNPs) de lugar a una mutación en la que dicho cambio tiene importantes consecuencias causando, en

muchos casos, trombofilia . Aunque la lista de SNPs asociados a ETV no deja de crecer nos centraremos en aquellas más implicadas clínicamente en las trombofilias por ser las más comunes en España: Factor V de Leiden, Protrombina G20210A, MTHFR C677T y Factor XII C46T. Aunque existen numerosos métodos para identificar estas mutaciones lo más común es aislar ADN genómico, emplear la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para conseguir una amplificación, emplear enzimas de restricción para el análisis de fragmentos y determinar las mutaciones pertinentes. (Ver Material y Métodos).

I.4. EL FUTURO DE LA TROMBOFILIA.

La trombofilia es una enfermedad multifactorial compleja, en la que múltiples interacciones entre factores genéticos y ambientales contribuyen al desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, pese a los grandes esfuerzos invertidos en la última década en el estudio de la enfermedad trombótica, los conocimientos sobre la base molecular de esta afección son escasos y sólo se conocen seis o siete factores genéticos que incrementan el riesgo de trombosis. Estos defectos genéticos sólo explican una pequeña parte de los casos de trombofilia hereditaria. (Soria., 2009). Además, es improbable que estos defectos genéticos conocidos, con sus bajas frecuencias en la población, constituyan la influencia genética primaria del riesgo de que se desencadene un efecto trombótico. El gran reto actual es la identificación por parte de los investigadores de nuevos factores genéticos que contribuyan a la variación interindividual del riesgo trombótico.

La perspectiva futura es generar una lista de todos los factores genéticos que contribuyen a los eventos trombóticos. Este conocimiento ayudará a diseñar estrategias de tratamiento y prevención a medida del perfil genético del individuo. (Holzman et al., 2000).

Actualmente con la automatización de los métodos de genotipificación de marcadores genéticos y secuenciación de ADN, con la información proporcionada por el proyecto Genoma Humano, junto con el gran avance de la estadística genética y del poder de cálculo que proporciona la informática moderna se dispone de las herramientas necesarias y se está en las condiciones de abordar con éxito el reto que supone el estudio de la base genética que subyace a la enfermedad tromboembólica. (Soria., 2009). La identificación de los nuevos factores genéticos y el estudio de su mecanismo fisiopatológico constituyen un paso fundamental en la comprensión de las bases moleculares de la trombosis lo que conlleva, a su vez, ventajas asistenciales muy claras como el mejorar la estrategia preventiva y terapéutica en los pacientes frente a situaciones de riesgo y episodios trombóticos futuros así como el poder identificar familiares afectos, la mayoría de ellos asintomáticos, que de otra forma no se beneficiarían de esta prevención.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

La enfermedad tromboembólica venosa (ETV) es una entidad extraordinariamente común en la mayoría de las especialidades médicas y quirúrgicas. En los países desarrollados, la trombosis –considerando las venosas y las arteriales– es la primera causa de mortalidad de los adultos, superando en más de tres veces la mortalidad producida por enfermedades neoplásicas.

La incidencia anual de la ETV es, aproximadamente, de 1-3 casos por cada 1.000 personas, pero crece exponencialmente con la edad: de menos de 5 casos anuales por cada 100.000 niños en la infancia, pasa a más de 400 casos anuales por cada 10.000 personas en adultos mayores de 80 años.

En la actualidad se admite que la trombofilia es una enfermedad multifactorial (interacción de factores genéticos y ambientales) y compleja, en la que la suma de múltiples genes –y, cada uno de ellos, con un efecto variable con el ambiente– determinan en cada individuo un grado de susceptibilidad a la trombosis. Es por ello que resulta fundamental el poder identificar cuáles son estos factores genéticos que predisponen a la trombosis.

Por ello nos planteamos el siguiente objetivo general:

Desarrollo y puesta a punto de un método nuevo basado en la reacción de extensión de una única base para la determinación simultánea (multiplex) de una manera simple, rápida y con una alta discriminación de las mutaciones más comunes en España asociadas con la trombofilia (G20210A en el gen de la Protrombina, G1691A en el gen del Factor V, C677T en el gen de la enzima Metilentetrahidrofolatorreductasa y C46T en el gen del Factor XII) usando la electroforesis capilar junto con la detección fluorescente para el diagnóstico

molecular tanto en pacientes con episodios tromboticos anteriores como en personas en riesgo de padecerlos.

Con este fin, el trabajo de investigación presente se ha desarrollado en base a los siguientes objetivos específicos:

1. Diseño de oligonucleótidos específicos y análisis de las mutaciones relacionadas con la trombofilia mediante la incorporación específica por PCR, en el punto exacto de la mutación, de ddNTPs.
2. Análisis de los productos amplificados mediante electroforesis capilar y detección fluorescente.
3. Estudio de las frecuencias de presentación de las mutaciones en 1499 pacientes.
4. Relación entre los distintos genotipos encontrados y las pruebas de laboratorio correspondientes al “Estudio de Trombofilia” en 931 de estos pacientes.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

III.1. PACIENTES.

En el presente estudio hemos analizado 1499 muestras de sangre de pacientes remitidos por el Servicio de Hematología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada entre octubre de 2007 y julio de 2010 con sospecha de trombofilia en base a los siguientes criterios:

Trombosis arterial y/o venosa previa.

Tromboembolismo pulmonar anterior.

Abortos de repetición.

Estudios familiares. (Antecedentes trombóticos).

El estudio genético fue realizado con el consentimiento informado de cada uno de los pacientes.

III.2. EXTRACCIÓN DEL DNA.

El DNA genómico fue extraído a partir de los leucocitos de 200 μ L de sangre periférica en el extractor automático de DNA “QUIAcube” de Izasa según lo especificado por dicha casa comercial y atendiendo al siguiente protocolo:

PROTOCOLO EXTRACCIÓN DNA QUIAcube:

Mientras se homogeniza la sangre, numerar:

Tubos 1.5 ml con el número de cada muestra.

Ponerlos en la columna.

En un tubo 2 ml de rosca: añadir 200 µL de sangre por cada muestra.

Añadir la proteasa, en tubo 1.5 ml, de acuerdo al número de muestras:

2 muestras_68 µL proteasa	7 muestras_176 µL proteasa
3 muestras_90 µL proteasa	8 muestras_198 µL proteasa
4 muestras_111 µL proteasa	9 muestras_219 µL proteasa
5 muestras_133 µL proteasa	10 muestras_241 µL proteasa
6 muestras_155 µL proteasa	12 muestras_284 µL proteasa

En el caso de procesar una u once muestras se pondrá un blanco con agua para equilibrar y será una muestra más.

Colocar el tubo con la proteasa en la posición A del QUIAcube, introducir la tapa del tubo en la ranura correspondiente.

Colocación de los tubos en el rotor adaptador Y del extractor QUIAcube.

Se comprueban los niveles de buffer y se rellena si es necesario. Hay que cambiar el agua desionizada y autoclavada cada vez que se procesen nuevas muestras.

Se colocan simuladores de silicona al lado de cada tubo de rosca.

Se selecciona el protocolo “dna 200 µl elution” en la pantalla del aparato y se siguen las instrucciones.



Figura 6. Extractor de DNA QUIAcube.

III.2.1. Cuantificación del DNA extraído.

La cuantificación de DNA se realizó midiendo la absorbancia (A) a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro UV (Jenway-Genova). Una unidad de absorbancia equivale, aproximadamente, a 50 ng/µL de DNA de doble hebra. Para determinar la pureza del DNA se calculó la relación entre la

absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm (A_{260}/A_{280}) que debe estar entre 1.7 y 1.9. Si es menor indica contaminación por proteínas.



Figura 7. Espectrofotómetro Jenway-Genova

III.3. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES EN LOS GENES DE LA PT, FV, MTHFR Y FXII.

III.3.1. Obtención de los amplicones para la detección de las mutaciones de los genes de la Protrombina, Factor V, MTHFR y Factor XII.

III.3.1.2. Protrombina.

Se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en la amplificación de una región del DNA de tamaño y secuencia específicos (*Mullis et al.*, 1986). Se utilizaron dos cebadores sintéticos de 20 y 26 nucleótidos (nt), complementarios a las zonas laterales que queríamos amplificar. La secuencia de cebadores se diseñó de tal forma que evitara la

formación de híbridos, de estructuras secundarias y con una distribución equilibrada de bases.

PROTROMBINA (G20210A) Extremo no codificante 3' (11p11) 14 exones

Secuencia de los cebadores:

Directo (D): 5'CTGGAACCAATCCCGTGAAA 3' 59°C/50% 20 nt

Indirecto (I): 5' CCAGTAGTATTACTGGCTCTTCCTGA 3' 58°C / 46% 26 nt

Amplicón: 143 nt donde se localiza la mutación a determinar consistente en el cambio de una guanina (G) por una adenina (A) en la posición 20210.

TCCCGAGTAGCTGGGACTCCAGGCATGTGCCACCATGCCAGCTAATTTTTTTGTAGAGA
GAGGGTTTTGCCATATTGCCCAGGCTGGTCTTGAAGTCTGAGCTCAAGTGATCCACCC
GGCTTGGGCATGAGCCACCTCCCCTGGTCTGGTCCAACCTTTTTAAAAGCATTATTCTGC
CTGTTGGGTGGAGAATAGACTGTAGGTGGGCAAAGAATGAAGGAAACTAGTGGGTTCAG
GAGCTCGAGCTAGAAGTGGTGAAGGGTTTTGGATTTGGGGTCTATGCTGAAGGTAGAG
CCGACAAGATTTGCTAGGATTGGATGGGTAGGGTGAGGAAGTGGGGACAGCAAGAATGA
CTGGAGGGGTAAGTGGACTCTCACCAGCTGTGTCTCGTGAAGGGGCGTGGCTGGGCTAT
GAGCTATGCTCCTGAGCACAGACGGCTGTTCTCTTTCAAGGTTACAAGCCTGATGAAGG
GAAACGAGGGGATGCCTGTGAAGGTGACAGTGGGGGACCCTTTGTGCATGAAGGTAAGCT
TCTCTAAAGCCCAGGGCCTGGTGAACACATCTTCTGGGGGTGGGGAGAACTCTAGTAT
CTAGAAACAGTTGCCTGGCAGGGGAATACTGATGTGACCTTGAACCTGACTCTATTGGA
AACCTCATCTTTCTTCTTCAGAGCCCCTTTAACAACCGCTGGTATCAAATGGGCATCGT
CTCATGGGGTGAAGGCTGTGACCGGGATGGGAAATATGGCTTCTACACACATGTGTTCC
GCCTGAAGAAGTGGATACAGAAGGTCATTGATCAGTTTGGAGAGTAGGGGCCACTCAT
ATTCTGGGCTCCTGGAACCAATCCCGTGAAAGAATTATTTTTGTGTTTCTAAACTATG
GTTCCCAATAAAAGTGACTCTCAGCGAGCCTCAATGCTCCAGTGCTATTTCATGGGCAG
CTCTCTGGGCCTCAGGAAGAGCCAGTAATACTACTGGATAAAGAAGACTTAAGAATCCAC
CACCTGGTGCACGCTGGTAGTCCGAGCACTCGGGAGGCTGAGGTGGGAGGAT

Figura 8. Región del gen de la PT (FII) donde se encuentran las mutaciones analizadas. Las zonas en verde corresponden a la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la obtención del amplicón y sombreado en rojo la del oligonucleótido que detecta la mutación. En rojo, la mutación

III.3.1.3. Factor V.

Se utilizaron dos cebadores sintéticos de 20 y 25 nucleótidos, complementarios a las zonas laterales que queríamos amplificar. La secuencia de cebadores se diseñó de tal forma que evitara la formación de híbridos, de estructuras secundarias y con una distribución equilibrada de bases.

FACTOR V LEIDEN (G1691A) Exón 10 de 25 (1q23)

Secuencia de los cebadores:

FVLD: 5' TGAGAGACATCGCCTCTGGG 3' 60°C / 60% 20 nt

FVLI: 5' CCAGGAGACCTAACATGTTCTAGCC 3' 60°C / 52% 25 nt

Amplicón: 150 nt donde se localiza la mutación a determinar consistente en el cambio de una guanina (G) por una adenina (A) en la posición 1691.

```
GGGGGTGGGGGGCGGGGGGAGGGATAGCATTAGGAGATATACCTAATGTTAATGACAAG
TTAATGGGTGCAGCACACCAACATGACACATGTATACATATGTAACAAACCTGCACGTT
GTGCACATGTACCCTAGAACTTAAAGTATAATTTAAAAAATAAAAAATAAAGAATTC
CTTTTGCAATATTAATTGGTTCCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTATCATGAAAT
AACTTTGCAAATGAAAACAATTTTGAATATATTTTCTTTTCAGGCAGGAACAACACCATG
ATCAGAGCAGTTC AACCAGGGGAAACCTATACTTATAAGTGGAAACATCTTAGAGTTTGA
TGAACCCACAGAAAATGATGCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACA
TCA TGAGAGACATCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAG AGCAGATCC
CTGGACAGGC AAGGAATACAGGTATTTTGTCTTGAAGTAACCTTTTCAGAAATTCTGAG
AATTTCTTCTGGCTAGAACATGTTAGGTCTCCTGGCTAAATAATGGGGCATTTCCTTCA
AGAGAACAGTAATTTGTCAAGTAGTCCTTTTTAGCACCAAGTGTGATAACATTTATTCTTT
TTTTTTTTTTGTCTTGTCTATTTTTATCAGTACCATCACTGCCGAAGGCAAGTCTAGAG
TGTGATAACATATTTTGTCTTAGTTTTCAAATTCAGGTCTGTTGGTATTGGATGTGTTG
AGCAAGTTGATTAGCCTTTCCTAATTTCTTCTTTTATCAAATGGGTAATAACCTCCT
AAAAATGTTACAGGTCTGTTTGGGGGTTTCAGTGAGATACCATCTGGTAAAAGTATAAAG
CTCTTTACCAGTCTTTGCTATTTTTAGAGACCTGCAATAGGGAGACAGAGGAGAGATTC
TCTGAAAGCAACCAAATTTAGAGACATAGTTCCTAGTGAAATTGGACCCAGATTATGGC
CCATCTCTGTTGAGACTAAAGTATACAGAAGAATGTGAACAAAGATACTGAATTTCTGA
GTTTGTCTTCATTGAAGAATTGTAGTCTCATATTATTAACCTAAAATTCCCAATTATGC
TAAACTGTAACCAAAGAGGTCTTATCTCAAGGCATACAAAATAAACATATGCCTAGAAA
AAGCAGAAAT
```

Figura 9. Región del gen del Factor V donde se encuentran las mutaciones analizadas. Las zonas en verde corresponden a la secuencia de oligonucleótidos utilizados para la obtención del amplicón y sombreado en rojo la del oligonucleótido que detecta la mutación. En rojo, la mutación.

III.3.1.4. MTHFR.

Se utilizaron dos cebadores sintéticos de 21 y 23 nucleótidos, complementarios a las zonas laterales que queríamos amplificar. La secuencia de cebadores se diseñó de tal forma que evitara la formación de híbridos, de estructuras secundarias y con una distribución equilibrada de bases.

METILENTETRAHIDROFOLATOREDUCTASA (C677T: V-A) Exón 4
1p36.3

MTHFRD: 5' GAGCTTTGAGGCTGACCTGAA 3' 58°C / 52% 21 nt

MTHFRI: 5' ATGTGTCAGCCTCAAAGAAAAGC 3' 59°C / 43% 23 nt

Amplicón: 92 nt donde se localiza la mutación a determinar consistente en el cambio de una citosina (C) por una timina (T) en la posición 677.

```
CTCAAGGCAGGACAGTGTGGGAGTTTGGAGCAATCCACCCCACTCTTGGAAGTGGGCT
CTGAGCCACCTCCCCTGAGAGTCATCTCTGGGGTCAGAAGCATATCAGTCATGAGCCCA
GCCACTCACTGTTTTAGTTTCAGGCTGTGCTGTGCTGTTGGAAGGTGCAAGATCAGAGCC
CCCAAAGCAGAGGACTCTCTCTGCCAGTCCCTGTGGTCTCTTCATCCCTCGCCTTGAA
CAGGTGGAGGCCAGCCTCTCCTGACTGTCATCCCTATTGGCAGGTTACCCCAAAGGCCA
CCCCGAAGCAGGAGCTTTGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTCTGCGG
GAGCCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTGAGGCTGACACATTCTTCCGCTTTGTG
AAGGCATGCACCGACATGGGCATCACTTGCCCCATCGTCCCCGGGATCTTTCCATCCA
GGTGAGGGGCCAGGAGAGCCCATAAGCTCCCTCCACCCCACTCTCACCCACCGTCCCT
CGCACAGGCTGGGGCTCTGGGTGGAGTGTGCTGAGTTCGCTGAGTTCTTCCAGATCTCC
TCTCAGGTCCAGAAGTTGCACAGCGTTGCTTGCCACCCCAATTTGGTTACCTCTAATT
TTCCCCCAAACCCAGCAACAGTGTCTGTTGAGGGTTTGTGTACTTTGGCCAACAA
GCATACCAAAGGGATTCTAATTCTCATTACAAATCCTGCTTAAATCAGTGTTTCCCA
AAGGTGGCTGTCATCAGAACCCTTGATAAGCTTTTTCAAAAAGTGGATCTCCAGGTCC
CACCCCTGGAGGTTCTCACTCAGTAAATCTGAGGGAGGTCCTCGGAATGTGTGTTTTAC
TTCTTGAGCTTGGCAGGTGATTCCGATGATCAGTGCAGCATGGGAACAGCTGGGTTAGA
TGACACCATGTTACCAACAGACACATCTAGGGCTAAAAGGCTGGCTCAACCCAAGGCTG
GAATGCTTAGGGCAGCTGCTCTACTCTGTAAAAAGTGGGAAAGCTGGGCATAGTGGCAC
GTGCCTGTAGTCCCGGCTACTTGAGAAGCTGAGGCAGGAGGATGGCTTGAGCCCTGGC
```

Figura 10. Región del gen del gen de la MTHFR donde se encuentran las mutaciones analizadas. Las zonas en verde corresponden a la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la obtención del amplicón y sombreado en rojo la del oligonucleótido que detecta la mutación. En rojo, la mutación.

III.3.1.5. Factor XII.

Se utilizaron dos cebadores sintéticos de 20 nucleótidos cada uno, complementarios a las zonas laterales que queríamos amplificar. La secuencia de cebadores se diseñó de tal forma que evitara la formación de híbridos, de estructuras secundarias y con una distribución equilibrada de bases.

FACTOR XII (C46T) 5q33

FXIID: 5' GATAGGCAGCTGGACCAACG 3' 59°C / 60% 20 nt

FXII I: 5' GC TCA TGG CTG TGA TAG CGA 3' 59°C / 55% 20 nt

Amplicón: 153 nt donde se localiza la mutación a determinar consistente en el cambio de una citosina (C) por una timina (T) en la posición 46.

CTATTGATCTGGACTCCTGGATAGGCAGCTGGACCAACGGACGGACGCCATGAGGGCTC
TGCTGCTCCTGGGGTTCTGCTGGTGAGCTTGGAGTCAACACTTTCGGTGAGTGCTGTG
GGAACCAGGATTGTCCAGGATTGTTCTGGGGGGTCGCTATCACAGCCATGAGCCATGG
CCTCTGCTCATGACCTGTGGGTCCAGGTGACTAGGAGGCCTATGTGGAAAGGTGAGGCC
AGCCCGGAAGGCCAGGCAGAGGAGACAGACAACCAGACTGGGTGGATAACAAGGCACA
GCCTGCATTTCTGGGGGAGATGGGCCTTAAGAAGACAACGGGGGGAGGTAGAAAGGGTT
TGGGTCTTGGGAAGAAATCTCTGCATTTCTGGGCTGTGAGAGGAAGCTGCAGACTAGCA
ACAGATCGGTGGCAGGCTATGACTTATAGTCAGTTCCTGCCTTCTTCTCTCCCTTGTA
GATTCCACCTTGGGAAGCCCCAAGGAGCATAAGTACAAAGCTGAAGAGCACACAGTCG
GTAAGTGGCCTGGCTCCTCCTCCCGGAACCTTGGGTGGGGATGTGTATGGTGCAGTG
TGTGCAGTCTCAGGGCAGTCTAGTCTAGTGCCTACCTGGTGCTAGGTCTTATGCCCATG
GGCACTAGAGTGATCGTGAGCTGTGTGATCCTTGAGGGCAGGGTATGGGCTGTGTCTAA
GTGCCACGAGCCTGGCTCGGAGCAGGTGCTTGAGATATGTGCTGCTGGCGCCATCACA
CCTGGGCTCCTGCCAGCCTTCTCAGTTTCCCCAGCTTCTCCCCTTCTTTTCCCTTTCCC
CAGTACGTCTCATGGGCATCATTATGCCACACAGAGGCCAGGGCCTTCAATGGGCAAG
GAAGGATCAAGAGCTTGTCTCTGGCATCTGAATGCCTCTGAAGCCCAGCTTTATCACTT
ATGAGCTGGGTGACTCTGGGCGAGGGATTTGAGTTCTCCAAGCTTCAATTTCCCCTTCT
GTGAAACCAGGTTGATAACAGTAAACCTCTTAGGGTTGTTGAGAAGGGAAACCCATGTG
AGGTATTCAGCCATCACCTGGTGCATGGAAATGCTTTACAAATATTAGCTTTTATTAT
GAAACTACCTTTTAGATGAAGGGTACCTGCCATTTCCCCCTTCTCAAGCTCTGCCATA
GCTCCCCATT

Figura 11. Región del gen del Factor XII donde se encuentran las mutaciones analizadas. Las zonas en verde corresponden a la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la obtención del amplicón y sombreado en rojo la del oligonucleótido que detecta la mutación. En rojo, la mutación.

III.3.2. Procedimiento para la amplificación de los amplicones donde se localizan las mutaciones a detectar en los genes de la protrombina, Factor V, MTHFR y Factor XII.

Reactivos:

- Agua desionizada estéril.
- Tubos de 200 μ L para PCR (MicroAmp® Applied Biosystems).
- dNTPs 10 mM cada uno (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).
- 2 cebadores de 40 μ M (Applied Biosystems) cada uno.
- 10X PCR Buffer II (Applied Biosystems). (AB).
- $MgCl_2$ 25nM (Applied Biosystems).
- Termociclador GeneAmp PCR system 2400- Applied Biosystems.

Técnica:

Con el fin de poner a punto la reacción de amplificación se estudió un rango de valores para los siguientes parámetros de la mezcla de reacción por separado:

- Concentración mínima de DNA: 25, 50 y 100 ng.
- Concentración de los cebadores: 0.1 y 0.2 μ M.

Para la primera PCR se realizó la siguiente mezcla para un volumen final de 25 μ L que se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 30 segundos:

- Buffer 10X.....2.5 μ L
- $MgCl_2$1.5 μ L
- dNTP 2.5 mM.....2.5 μ L
- TAQ GOLD DNA Polymerase (AB).....0.3 μ L
- PRIMER 1.25 μ M.....4 μ L
- DNA.....100 ng

- H₂O.....c.s.p. 25 µL

Por otro lado se realizó la puesta a punto de los parámetros técnicos óptimos para el desarrollo de la amplificación. En este sentido se estudió:

- Temperatura de hibridación: 50, 55, 58, 59 y 60°C.
- Ciclos: 30, 35 y 40 ciclos.

La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador Gene Amp PCR Systems 2400 (Applied Biosystems).



Figura 12. Termociclador Gene Amp PCR Systems 2400.

Se llevaron a cabo distintos programas de amplificación utilizando diferentes concentraciones de ADN (25, 50 y 100 ng), distintas concentraciones de cebadores a diferentes temperaturas de hibridación (50, 55, 58, 59 y 60°C). Para todos los casos se usó una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C durante 10 minutos y una temperatura de extensión de 72°C durante 2 minutos

que se mantiene una vez finalizados los ciclos (30, 35 y 40) durante 7 minutos. Cada ciclo tenía una duración de 30 segundos.

Las muestras obtenidas pueden ser procesadas inmediatamente o conservadas a -20°C hasta su uso.

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis capilar y detección fluorescente en un analizador genético ABI PRISM 310 de Applied Biosystems siguiendo un protocolo que se detalla posteriormente.

III.3.3. Limpieza de los productos amplificados.

A continuación se realizó la limpieza enzimática del producto de amplificación. Para ello se cogen 5µL de la mezcla de reacción de la primera PCR y se añade uno a uno:

- 0.5 µL de Exonucleasa I.
- 2 µL de SAP.
- 2 µL de buffer 10X RX.

Se introduce esta mezcla en el Termociclador 60 minutos a 37 °C y 15segundos a 75 °C.

III.3.4. Detección SnaPShot.

Para esta segunda amplificación las secuencias de los cebadores (Tabla 5) se diseñaron para evitar la formación de híbridos y estructuras secundarias. Los cebadores fueron diseñados con tamaño suficientemente diferente añadiéndole una cola de timinas y adeninas de 20 nt en el oligonucleótido que detecta la mutación de la protrombina, 10 nt en el del Factor V y 16 para el del

Factor XII, dando como resultado un número de nucleótidos totales de 39, 29, 19 y 34 nt para los oligonucleótidos que detectan las mutaciones PTG20210A, FVG1691A, MTHFRC677T y FXIIC46T respectivamente para poder ser analizados posteriormente, de un modo exacto ,en el analizador genético en una reacción multiplex de forma simultánea.

Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos usados para la detección SnapShot de las mutaciones PTG20210A, FVG1691A, MTHFRC677T y FXIIC46T.

Mutación	Secuencia del cebador
G20210A	5'TATATTTATTATTAATTATTCCTGGGAGCATTGAGGCT 3'
G1691A	5' TTATATATTAAGCAGATCCCTGGACAGGC 3'
C677T	5' GAGAAGGTGTCTGCGGGAG 3'
C46T	5' TTATTTAATTTATACAGCAGAGCCCTCATGGC 3'

Cada cebador se unirá complementariamente al DNA en presencia de ddNTPs (dideoxi NTPs) marcados fluorescentemente, [F]ddNTPs. (Tabla 6). La polimerasa sólo extenderá el producto de PCR en un solo nucleótido.

Tabla 6. Fluoróforos unidos a cada uno de los ddNTPs

ddNTP	Fluoróforo	Color analizado
A	dR6G	Verde
C	dTAMRA TM	Negro
G	dR110	Azul
T	DROX TM	Rojo

Reactivos:

- ✓ Agua desionizada estéril.
- ✓ Tubos de 200 μ L para PCR (MicroAmp® Applied Biosystems).
- ✓ SNaPshot multiplex Ready Reaction Mix (ABI Prims®SNaPshot™ Kit, Applied Biosystems).
- ✓ 4 cebadores 0.2 μ M cada uno.
- ✓ Termociclador GeneAmp PCR system 2400-Applied Biosystems.

Técnica:

Con el fin de poner a punto cada una de las reacciones de amplificación para cada ensayo (una para cada mutación), se estudió la concentración de los cebadores en un rango de 0.2-0.4 μ M. La reacción de SNaPshot contenía en un volumen final de 10 μ L:

- 5 μ L de SNaPshot multiplex Ready Reaction Mix (ABI Prims®SNaPshot™ Kit, Applied Biosystems).
- 1 μ L del producto de la primera amplificación.
- 1 μ L de Primers (concentración final de cebadores entre 0.2 a 0.4 μ M).
- 3 μ L de agua desionizada destilada.

Además se estudió la temperatura de hibridación con un rango entre 55-60°C con el siguiente programa de amplificación: 10 minutos a 95°C, seguido de 15 segundos a 95°C y a continuación 59°C durante 1 minuto durante 30 ciclos.

Las muestras obtenidas pueden ser usadas inmediatamente o guardadas a -20°C hasta su utilización.

Con el fin de eliminar los [F]ddNTPs no incorporados, se trata el producto de PCR con 1 μ L de SAP y 1 μ L de buffer 10X RX sometiéndolo al siguiente programa en el Termociclador: 60 minutos a 37°C seguido de 15 segundos a 75°C.

III.3.5. Electroforesis capilar y detección fluorescente.

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM® 310 de Applied Biosystem.

Reactivos:

- Agua desionizada estéril.
- Formamida desionizada (Hi Di™ Applied Biosystem).
- Marcador de peso molecular (GeneScan®-120 [LIZ]™ Applied Biosystem).
- Buffer con EDTA (ABI PRISM® 310 10X).
- POP-4™ (Performance Optimized Polymer 4, Applied Biosystem).
- Capilar de sílice (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer Capillary de 47 cm de longitud, 50 μ m de diámetro).
- Jeringa 1 mL.
- Dos viales de 4 mL para el buffer y el agua.
- Gradilla con 48 pocillos.
- Tubos de 0.5 mL (Genetic Analyzer Applied Biosystem).
- Tapones (Applied Biosystem).
- Microcentrífuga (Centrifuge 5410 eppendorf).
- Termociclador (GeneAmp® PCR System 9600).
- Analizador genético ABI PRISM® 310 de Applied Biosystem.

III.3.5.1. Preparación de los productos amplificados.

Previamente a la electroforesis se mezclaron en un tubo para ABI 310 de 0.5 mL:

1 μ L del producto amplificado. (Mezcla de la 2ª PCR limpia).

13.5 μ L de formamida desionizada.

0.5 μ L del marcador de pesos moleculares GeneScan®-120 [LIZ]TM.

Se someta a vortex durante 15 segundos y se centrifuga a 5000r.p.m. durante 30 segundos.

Las muestras se llevaron al termociclador a 95°C para su desnaturalización durante 5 minutos e inmediatamente después se pusieron en hielo hasta ser procesadas.

III.3.5.2. Preparación del equipo.



Figura 13. Analizador genético ABI 310.

Antes de inyectar las muestras en el analizador es necesario la puesta a punto del mismo, para lo cual se llevarán a cabo los siguientes pasos:

1. Establecer comunicación entre el analizador y el ordenador. Para ello es importante encender primero el ordenador y después el ABI PRISM.
2. Se abre el software de recogida de datos “ABI PRISM™ 310 Data Collection”. Este programa recoge el dato crudo del análisis de los fragmentos en cada carrera. El dato crudo es la fluorescencia detectada por la cámara CCD de los fragmentos marcados, separados en el capilar por electroforesis y excitados por el láser al pasar por la ventana de detección.
3. Colocar el bloque de metacrilato limpio y seco.



Figura 14. Interior del analizador genético ABI 310.

4. Colocar el capilar. Antes de su colocación es necesario limpiar la ventana del capilar con un papel empapado en etanol absoluto. Tras limpiar la ventana se introduce el capilar en la válvula que lo conecta con el bloque de metacrilato hasta llegar a la primera intersección y se aprieta bien la válvula; es importante no rebasar esta primera

intersección para que el polímero pueda penetrar en el capilar. A continuación se sitúa la zona de lectura del capilar en la ventana del láser, se introduce el otro extremo en la parte que contiene el electrodo negativo o cátodo y se desliza hasta que queden a la misma altura. Por último se sujeta el capilar con una cinta adhesiva contra la placa térmica.

5. Establecer la posición de la jeringa y el “autosampler”. Realizar la calibración del “autosampler”.
6. Preparar 15 mL de buffer 1X y llenar los viales de buffer del cátodo y del ánodo hasta la marca.
7. Rellenar el capilar y el bloque de metacrilato con el polímero. El polímero utilizado para el análisis de fragmentos es el POP-4 y debe mantenerse entre 4 y 8°C. Media hora antes de su uso se saca del frigorífico para que se atempere. Con la jeringa bien limpia se toma el volumen de polímero necesario en función del número de muestras a analizar, se enrosca bien para evitar la pérdida de polímero y se llenan los conductos del bloque de metacrilato evitando la formación de burbujas de aire.

III.3.5.3. Programación de las muestras.

III.3.5.3.1. Hoja de muestras (“sample sheet”).

Una vez abierto el programa ABI PRISM® 310 Collection se abre una nueva hoja de muestras donde se introducirán los datos de cada muestra (número de muestra y fecha de análisis) así como su posición en la gradilla. La

primera posición (A1) siempre se reservará para un test. A continuación se indicará que trabajaremos con cinco colores (Figura 15). Por último se guarda la hoja en su carpeta correspondiente y se procede a la realización de la lista de inyección.

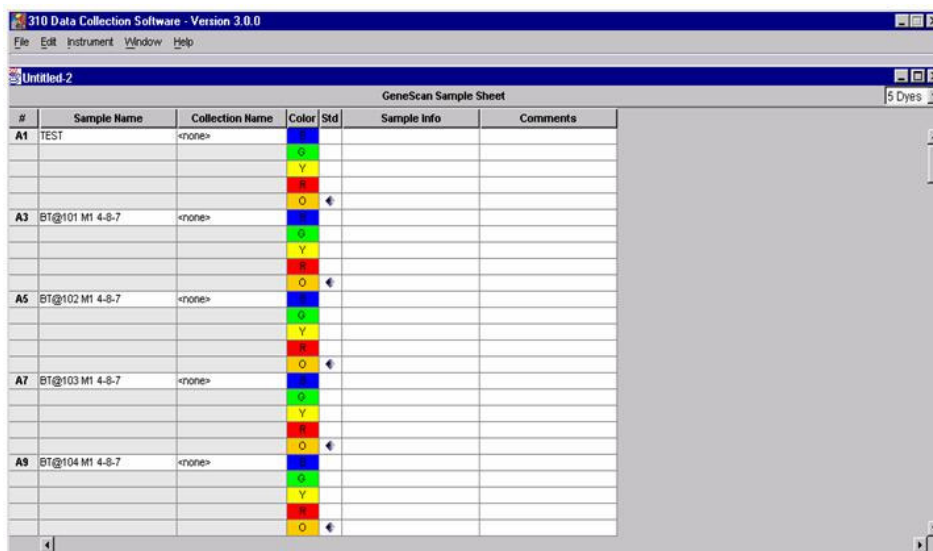


Figura 15. Hoja de muestras “sample sheet”.

III.3.5.3.2. Lista de inyección.

En esta lista se incorpora la hoja de muestras creada (“sample sheet”). En ella es posible modificar el orden de inyección de las muestras e incluso repetir algunas de las muestras, cambiando algunos de los parámetros como el tiempo de inyección. La primera columna indica los datos de las muestras. La segunda columna especifica el módulo de análisis, el cual contiene las funciones específicas ejecutadas para el proceso de análisis de las muestras.

(Figura 10). Para nuestro caso el módulo seleccionado es el GS STR POP 4 (1mL) E5 y la matriz: GS_SNP_E_5 colores. Este módulo establece unas condiciones de electroforesis que pueden ser modificadas:

- Voltaje y tiempo de inyección (para inyección electrocinética): ambos parámetros pueden ser variados para regular la cantidad de DNA que entre en el capilar. Así, en el caso de obtener una señal débil en una muestra, es posible aumentar el tiempo de inyección con el objetivo de permitir que se inyecte más cantidad de producto amplificado al capilar y que aumente la señal de fluorescencia. No obstante, un tiempo de inyección excesivo puede originar una disminución en la resolución. Teniendo en cuenta lo anterior, se estimó un tiempo de inyección de 5 segundos.
- Voltaje de electroforesis: el voltaje estándar es de 319 V/cm para fragmentos analizados usando el polímero POP-4. Para un capilar de 47 cm esto supone un voltaje total de 15 KV y la corriente a este voltaje es de 7-9 μ A. Bajo estas condiciones electroforéticas el tiempo necesario para que un fragmento de 400 pares de bases (pb) llegue a la ventana de detección es de unos 25 minutos aproximadamente.
- Temperatura de electroforesis: para análisis de fragmentos esta temperatura debe ser de 60°C.
- Tiempo de electroforesis: normalmente el tiempo de electroforesis programado es un 10% superior a la media del tiempo necesario para que se produzca la migración del fragmento de mayor tamaño que nos interese. Tras varios ensayos empleando distintos tiempos se estimó un tiempo de 24 minutos.



Figura 16. Lista de inyección.

Antes de comenzar la inyección de las muestras se llevan a cabo dos funciones en el analizador genético:

1. En primer lugar es necesario el relleno del capilar (“Seq fill capillary”) con el polímero.
2. A continuación se realizará el test de los cinco colores (“Test CCD 5-Color”) cuya función es comprobar que la ventana del capilar está limpia y colocada correctamente. Este test tiene una duración de cinco minutos y en el debemos comprobar que la línea basal de los cinco colores está entre 800 y 2500 en escala vertical (intensidad de fluorescencia). Si no es así se procederá a limpiar el capilar y a repetir el test hasta que salga entre los valores anteriormente indicados. (800-2500).

Una vez completada la lista de inyección y habiéndose alcanzado la temperatura de electroforesis se inicia el análisis electroforético pulsando el icono “run”.

III.3.5.4. Análisis de los resultados.

Los fragmentos obtenidos se analizaron con el filtro E y su matriz correspondiente (matriz matemática que corrige el posible solapamiento espectral de la emisión fluorescente) GS_SNP_E_5colores. Para analizar los resultados se utilizó el programa ABI PRISM® GeneScan v3.7.1 (Applied Biosystem) para determinar con exactitud cada tamaño de pico. Esto es posible gracias a la comparación de la movilidad electroforética de cada producto de amplificación con la curva de calibración creada con los fragmentos del estándar analizados simultáneamente en cada muestra.

Para finalizar es muy importante seguir el siguiente orden:

1. Cerrar “Data Collection”.
2. Apagar ABI PRISM.
3. Apagar el ordenador.

III.4. PRUEBAS DE LABORATORIO.

III.4.1. Batería de pruebas del estudio de trombofilia.

De los 1499 pacientes a los que se realizó el análisis genético de trombofilias consistente en la determinación de las mutaciones G20210A en el gen de la protrombina, G1691A en el gen del Factor V, C677T en el gen de la MTHFR y C46T en el gen del Factor XII, se recogieron los datos de laboratorio de 931 de ellos correspondientes al “Estudio de Trombofilias” realizado en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario San Cecilio de Granada y consistente en 21 parámetros que se citan a continuación. (Tabla 7).

Tabla 7. Perfil del “Estudio de Trombofilias”.

Prueba	Valor de referencia
Actividad de protrombina	(70-130) %
Tiempo de trombina	(13-22) seg
INR	(0.8-1.3)
Fibrinógeno (Clauss)	(180-400) mg/dL
Dímero D	(0-234) ng/mL
Factor VIII	(50-120) %
APTT	(22-32) seg
ATIII funcional	(80-120) %
Proteína C funcional	(50-130) %
Proteína S funcional	(50-130) %
VV Russel diluido Scream	0-1.2
Resistencia a la proteína C	>2.04
Test de Exner	Negativo
Homocisteína	(5-15) μ mol/L
TTPA-SP (ratio)	22-32
Plasminógeno	(76-126) %
Ac Anticardiolipina IgM	(0-12)U.GPL
Ac Anticardiolipina IgG	(0-12) U.GPL
Ac β -2 glucoproteína 1 IgM	(0-7) U/mL
Ac β -2 glucoproteína 1 IgG	(0-12) U/mL
A-2-Antiplasmina	(80-120) %

III.4.2. Instrumentación requerida.

Las pruebas de coagulación: Actividad de protrombina, tiempo de trombina, INR, Fibrinógeno, Dímero D, Factor VIII, APTT, ATIII funcional, Proteína C funcional, Proteína S funcional, VV Russel, resistencia a la proteína C, Test de Exner, TTPA-SP, plasminógeno y α -2-antiplasmina se llevaron a cabo en el Coagulómetro ACL TOP, Modelo 3G, de IZASA según las instrucciones referidas por el fabricante. Para ello fue necesaria una muestra de plasma con citrato.

La determinación de los niveles de homocisteína se realizó en el aparato INMUNOLITE 2000XPi (Immunoassay System) de SIEMENS siguiendo las instrucciones referidas por el fabricante. Para ello fue necesaria una muestra de sangre total con EDTA remitida en frío.

Las pruebas de anticuerpos: Ac Anticardiolipina IgM, Ac Anticardiolipina IgG, Ac β -2 glucoproteína 1 IgM y Ac β -2 glucoproteína 1 IgG se llevaron a cabo en el aparato de inmunología INMUNOCAP 250 de PHADIA AB según las instrucciones referidas por el fabricante. Para ello fue necesaria una muestra de suero.

III.5. MÉTODO ESTADÍSTICO EMPLEADO.

El primer paso para la realización del tratamiento estadístico es la creación de una base de datos. En el caso de la presente Tesis se ha creado una base de datos, utilizando el paquete de programas SPSS versión 15.0, que también se ha usado para realizar el tratamiento estadístico de los mismos.

Los procedimientos para analizar dichos datos han sido los siguientes:

III.5.1. Estadística Descriptiva.

Para todas las variables cuantitativas continuas y discretas se ha empleado en primer lugar el procedimiento de estadística descriptiva (Procedimiento Frecuencias) para hallar los parámetros muestrales fundamentales: Media, desviación típica, error estándar de la media, valores mínimo y máximo observados en la muestra así como el número de casos sobre los que se han realizado los cálculos.

De igual manera mediante el procedimiento Medias dentro del Módulo de Comparar medias se ha realizado el mismo procedimiento descriptivo hallando los distintos parámetros muestrales pero no de todos los sujetos, sino diversificando por las mutaciones genéticas presentadas (NPM, HOM, HT) y sus combinaciones para los distintos factores (Protrombina, Factor V, MTHFR y Factor XII).

Para las variables cuantitativas discretas y las cualitativas se ha aplicado el procedimiento Frecuencias que nos proporciona las tablas con las frecuencias absolutas de aparición de cada modalidad ó valor de la variable considerada así como sus frecuencias relativas expresadas como porcentajes.

De igual modo mediante el módulo de gráficos se representan las distribuciones de frecuencias de dichas variables mediante los correspondientes diagramas de barras y barras de error con las medias +/- el error estándar de la media para cada una de las variables continuas en los distintos grupos analizados.

III.5.2. Estadística Inferencial.

Con el fin de realizar las comparaciones de los diferentes parámetros analizados con el procedimiento más correcto posible se deben comprobar los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas y también si existe alguna observación extrema que pueda conducirnos a un resultado erróneo.

En primer lugar se ha aplicado para cada variable cuantitativa continua y cada grupo los test de normalidad de Kolmogorov- Smirnov y Shapiro-Wilk, dentro del módulo de EXPLORAR. Si dicho test nos da significativo indica que, en la población de la cual procede la muestra considerada, la variable estudiada no sigue la distribución normal. En estos casos aplicaremos transformaciones apropiadas a los datos y si no se corrige la no normalidad y/o la heterogeneidad de varianzas se utilizan procedimientos no paramétricos para estudiar las cuestiones planteadas acerca de esas variables no normales.

Como nuestro interés se centra en la comparación de las variables de estudio medidas sobre todos los individuos de la muestra para saber si existen diferencias entre los grupos establecidos por las distintas mutaciones realizamos en caso de normalidad el Análisis de la Varianza (ANOVA). En dicho procedimiento también se nos proporciona el test de Levene de comparación de Varianzas. En caso de varianzas desiguales se nos proporcionan los test robustos de Welch y Brown-Forsythe que tienen en cuenta dichas desigualdades.

En caso de resultar significativo el ANOVA se realizan todas las comparaciones por parejas utilizando los test Post-hoc para las comparaciones múltiples. En nuestro caso se ha utilizado el test de Bonferroni, por ser los tamaños muestrales distintos) para el caso de varianzas iguales y el test de Tahmane para el caso de varianzas distintas. En el ANOVA se nos proporciona los valores de la

media, desviaciones típicas muestrales y error estándar de la media en cada grupo, así como un intervalo de confianza(al 95%) para la media en cada población y los valores mínimo y máximo observados en cada muestra.

Para las variables no normales se utiliza el correspondiente Test no paramétrico de Kruskal-Wallis (para varias muestras independientes), basados en la ordenación de los datos de las muestras conjuntamente y en la asignación de rangos ó números de orden a cada una de las observaciones. Posteriormente se comparan los rangos promedios de las distintas muestras. En caso de resultar significativo nos indica que en alguna de las muestras (y por tanto en las poblaciones de las que se han extraído esas muestras) se están dando valores más altos o más bajos que en el resto, por lo que se procede a realizar las comparaciones múltiples posteriores (con la corrección de Bonferroni) para detectar que grupos pueden considerarse homogéneos y cuales difieren entre sí.

Para realizar el test para comprobar si dos variables cualitativas están relacionadas entre sí se aplica el test de independencia de la χ^2 ó en caso de no verificarse las condiciones de validez por existir más frecuencias esperadas menores que cinco de las permitidas (máximo un 20%) el Test exacto de Fisher.

En general, para poder afirmar a un error global alfa del 0,05 en que variables del total se presenta significación se ha de aplicar la llamada “penalización” de Bonferroni que consiste en dividir el error α por el número de variables a comparar. Para que una comparación sea significativa deberá serlo para α/k , siendo k el nº de variables que se comparan.

En todos los test aplicados un resultado se considera significativo y por tanto indicativo de que podemos concluir que existe diferencia entre ambas poblaciones cuando el valor P(nivel de significación) sea inferior ó igual a 0,05, (*) considerándose muy significativo cuando P sea menor que 0.01(**) y altamente significativo si P es menor que 0,001(***). Cuando no hay significación

pero P está comprendido entre 0,05 y 0,10 lo indicaremos como que existen “indicios de significación”. En estos casos la no significación puede ser debida a un insuficiente tamaño de muestra.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS.

IV.1. ESTABLECIMIENTO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DE LOS GENES DE LA PT, FV, MTHFR Y FXII.

Con el fin de llevar a cabo el diagnóstico molecular de las mutaciones en estos genes, hemos desarrollado y puesto a punto una nueva técnica basada en la detección fluorescente y electroforesis capilar mediante un ensayo de extensión de una única base, que comprende dos reacciones de amplificación:

En la primera reacción se amplifica el fragmento de DNA que comprende las mutaciones objeto de estudio (PT G20210A, FV G1691A, MTHFR C677T y FXII C46T). El amplicón obtenido se encuentra en solución junto con el enzima Taq polimerasa, los componentes del buffer, los cebadores y los dNTPs que no hayan reaccionado. Para evitar la participación de los cebadores y de los dNTPs en la reacción de extensión de un solo nucleótido, estos se eliminan respectivamente con las enzimas exonucleasa y con la fosfatasa alcalina.

En la segunda reacción de extensión de un solo nucleótido, los cebadores diseñados difieren en su longitud para evitar el solapamiento entre los productos que se obtengan. Cada cebador se une complementariamente al DNA. En presencia de ddNTPs marcados fluorescentemente ([F]ddNTPS), la polimerasa sólo extenderá el producto de PCR en un nucleótido.

Para la detección de la mutación PT G20210A se incorporará un nucleótido de citosina (marcado en negro) en el caso de un alelo normal y un nucleótido de timina (marcado en rojo) en el caso de un alelo mutado. Para la detección de la mutación FV G1691A se diseña el oligonucleótido que hibridaría en la hebra complementaria que incorporará un nucleótido de guanina (marcado en azul) en el caso de un alelo normal y un nucleótido de

adenina (marcado en verde) en el caso de un alelo mutado. Para la detección de la mutación MTHFR C677T se diseña el oligonucleótido que hibridaría en la hebra complementaria que incorporará un nucleótido de citosina (marcado en negro) en el caso de un alelo normal y un nucleótido de timina (marcado en rojo) en el caso de un alelo mutado y finalmente para la mutación FXII C46T se incorporará un nucleótido de guanina (marcado en azul) en el caso de un alelo normal y un nucleótido de adenina (marcado en verde) en el caso de un alelo mutado.

Los [F]ddNTPs que no se incorporen pueden migrar junto con los fragmentos objeto de nuestro estudio. Para evitar esta interferencia se eliminan mediante un tratamiento con fosfatasa alcalina.

El análisis de las muestras se realiza mediante electroforesis capilar y detección fluorescente y los datos obtenidos se analizan con el software GeneScan v3.7.1. Para que el análisis sea satisfactorio y robusto, se utilizó un marcador interno de peso molecular marcado con el fluoróforo LIZ [GeneScan 120 LIZ (15-120 nt)] especialmente diseñado para ser usado en la detección de fragmentos pequeños.

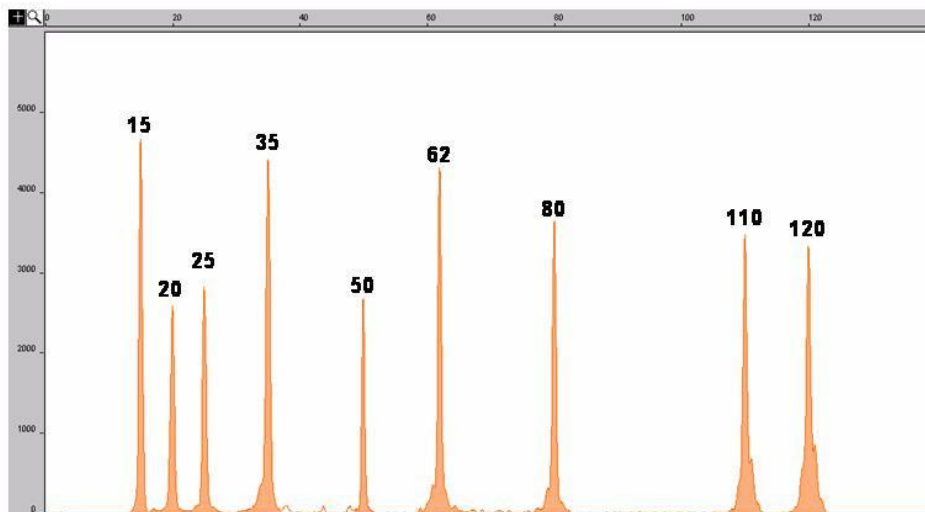


Figura 17. Electroforegrama del marcador interno GeneScan 120 LIZ de pesos moleculares con la asignación específica del tamaño de los picos usados para el análisis de las muestras.

A cada fragmento específico del marcador interno se le asigna su tamaño correspondiente y esta información es utilizada por el *software* para construir una curva patrón usando el método *Local Southern*, que determina el tamaño de fragmentos usando la relación recíproca entre la longitud del fragmento y su movilidad (Figura 17).

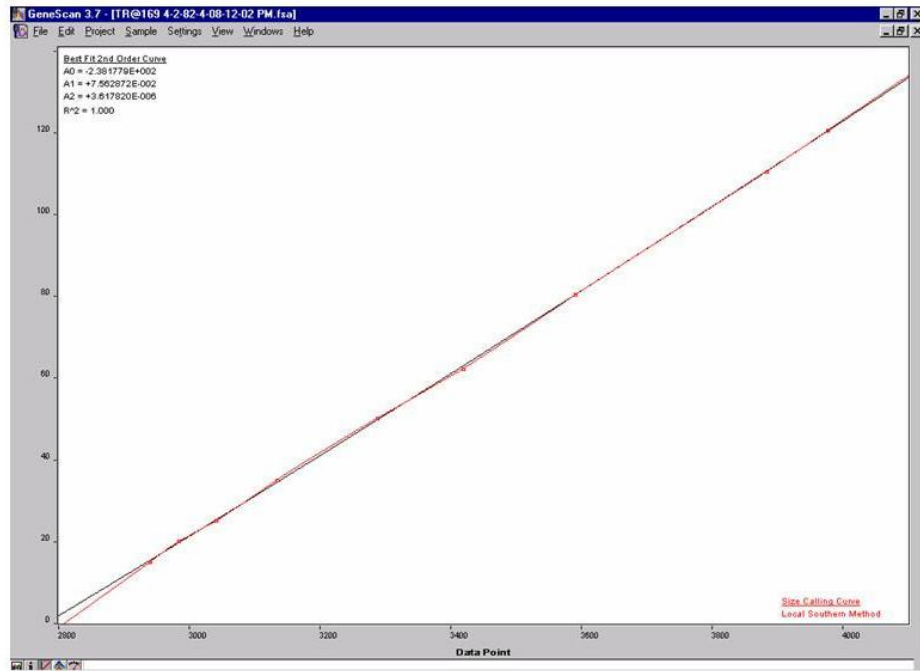


Figura 18. Curva patrón del marcador interno de peso molecular GeneScan LIZ 120.

Los fluoróforos usados en el marcaje de los ddNTPs modifican la movilidad electroforética de los fragmentos de DNA, así, los tamaños obtenidos tras el análisis diferirán en unas pocas bases del tamaño real. Esto es debido a que la contribución relativa del fluoróforo en la movilidad electroforética es mayor en los fragmentos cortos.

Tabla 8 .Tamaño en nucleótidos (nt) y color de cada uno de los alelos (Al) normales y mutados en los genes estudiados.

Gen/ Mutación	Al. normal(nt) y Color		Al. mutado(nt) y Color	
PT G20210A	42	Negro	43	Rojo
FV G1691A	30	Azul	32	Verde
MTFR C677T	15	Negro	28	Rojo
FXII C46T	34	Azul	36	Verde

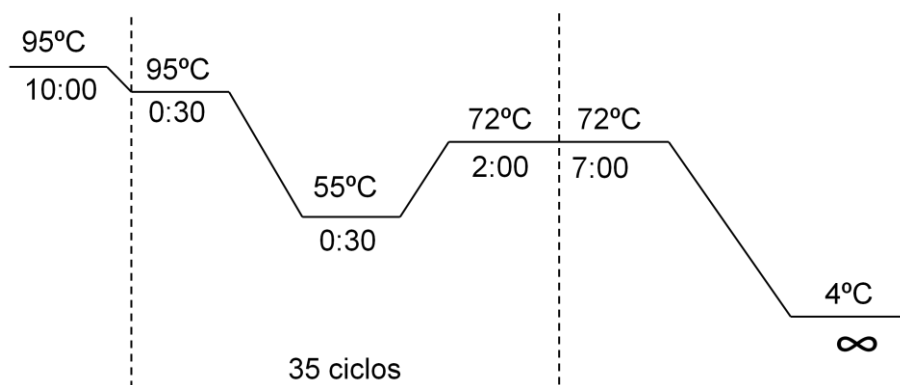
De las distintas concentraciones de DNA, cebadores, temperaturas de hibridación y ciclos expuestos en Material y Métodos para establecer las condiciones óptimas para la obtención del amplicón donde se encuentran las mutaciones y para el ensayo de extensión de un único nucleótido se determinaron las siguientes como las más adecuadas:

Concentración DNA: 50 ng

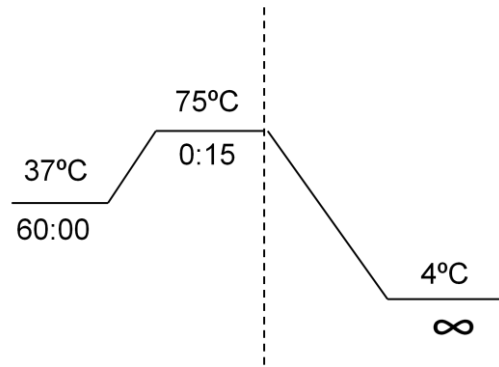
Concentración de los cebadores: 0,2 μ M.

Temperatura de hibridación: 55°C

Ciclos: 35.



Una vez finalizada la primera PCR se realiza un tratamiento enzimático con EXO I y SAP (ver Material y Métodos) y se somete al siguiente programa en el termociclador:



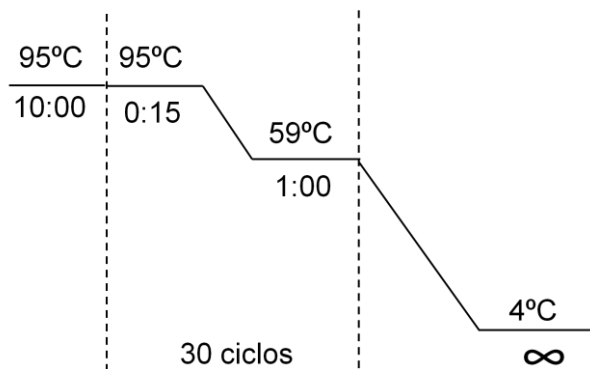
Tras esta limpieza se procede a la realización del Ensayo de Extensión de un único nucleótido con las siguientes características:

Concentración de los cebadores: 0,2 μ M.

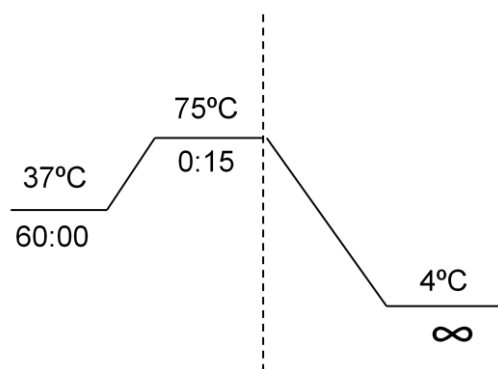
Temperatura de hibridación: 59°C

Ciclos: 30.

Después se somete al siguiente programa en el termociclador:



Por último se llevó a cabo un tratamiento enzimático con SAP de la segunda PCR tal como se detalla en Material y Métodos. El programa en el termociclador fue el siguiente:



La aplicación de este método en una muestra de DNA perteneciente a un individuo que no presenta ninguna de las mutaciones objeto de estudio permite distinguir en una única reacción multiplex los siguientes picos (Figura 18):

- Un primer pico (negro) correspondiente al alelo normal para la mutación C677T para el gen de la MTHFR.
- Un segundo pico (azul) correspondiente al alelo normal para la mutación G1691A para el gen del Factor V.
- Un tercer pico (azul) correspondiente al alelo normal para la mutación C46T para el gen del Factor XII.
- Un cuarto y último pico (negro) correspondiente al alelo normal para la mutación G20210A para el gen de la Protrombina.

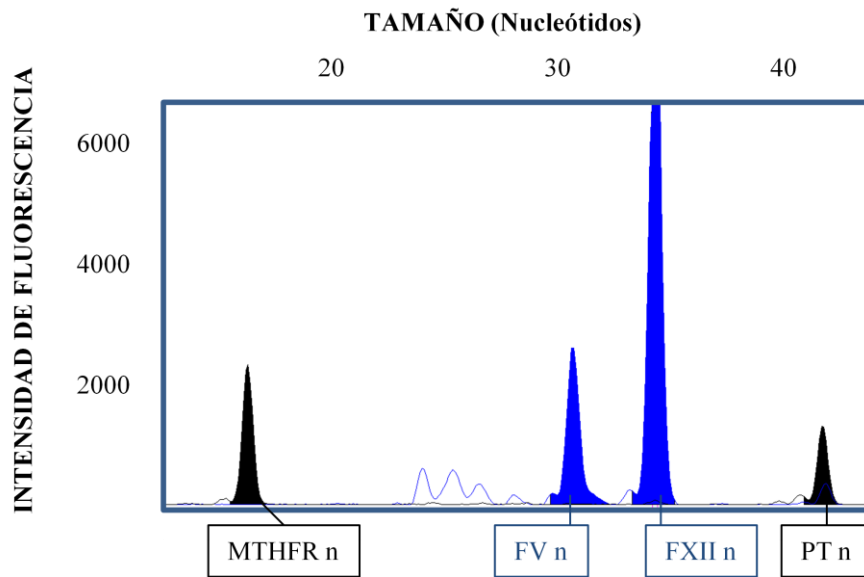


Figura 19. Electroforegrama de un individuo con alelo normal para todas las mutaciones estudiadas.

En el análisis multiplex de los 1499 pacientes estudiados se detectaron los siguientes genotipos: Mutación C677T del gen de la MTHFR en heterocigosis, mutación C677T del gen de la MTHFR en homocigosis, mutación G1691A del gen del FV en heterocigosis, mutación G1691A del gen del FV en homocigosis, mutación C46T del gen del FXII en heterocigosis, mutación C46T del gen del FXII en homocigosis y mutación G20210A del gen de la PT en heterocigosis cuyos resultados se muestran en las figuras 20 a 34 donde “m” indica alelo mutado y “n” alelo normal.

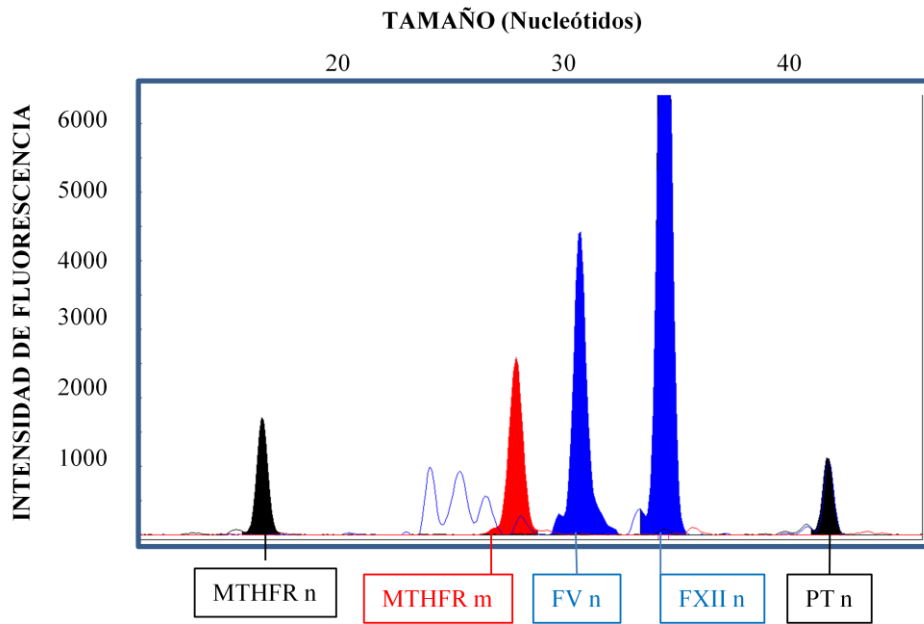


Figura 20. Electroforegrama correspondientes a un paciente heterocigoto para la mutación C677T en el gen de la MTHFR.

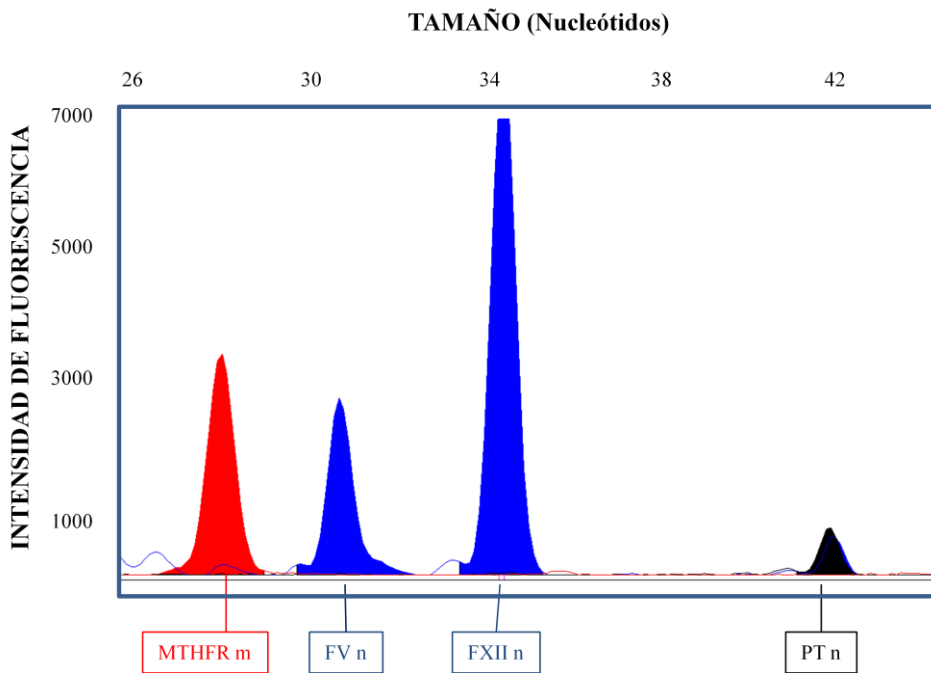


Figura 21. Electroforegrama correspondientes a un paciente homocigoto para la mutación C677T en el gen de la MT

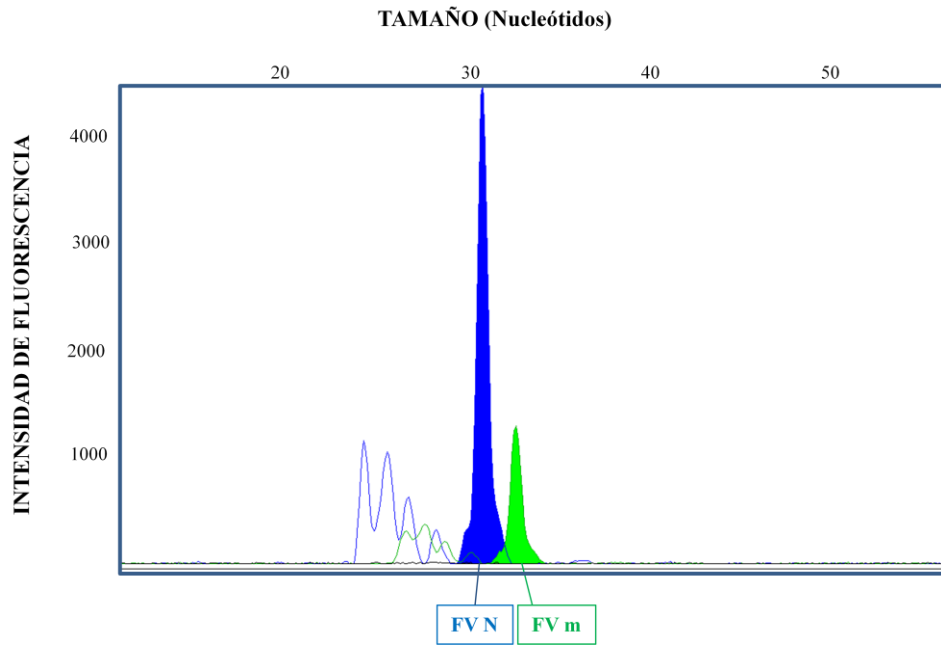


Figura 22. Electroforegrama correspondiente a un paciente heterocigoto para la mutación G1691A en el gen del Factor V.

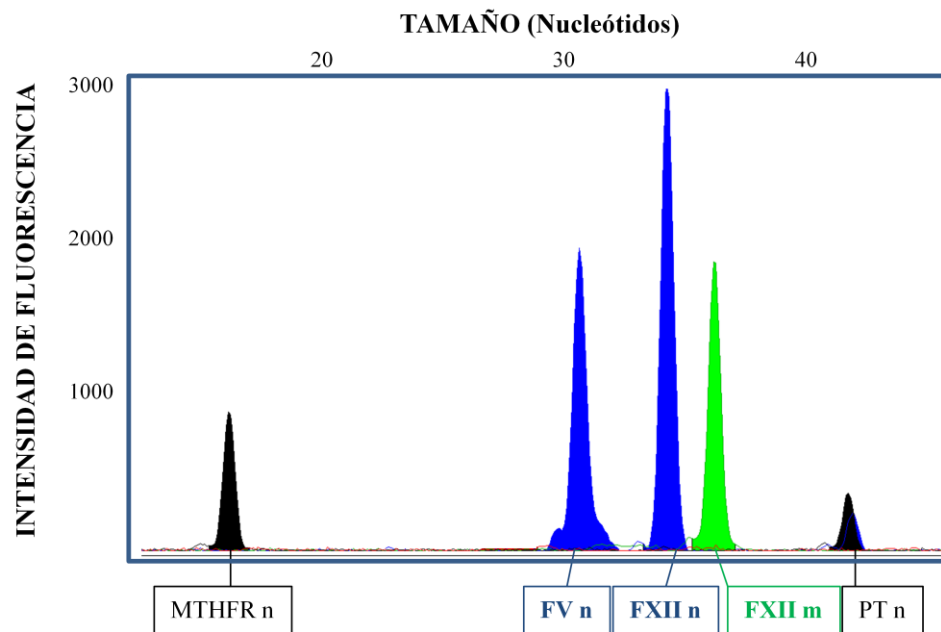


Figura 23. Electroforegrama correspondientes a un paciente heterocigoto y para la mutación C46T en el gen del Factor XII

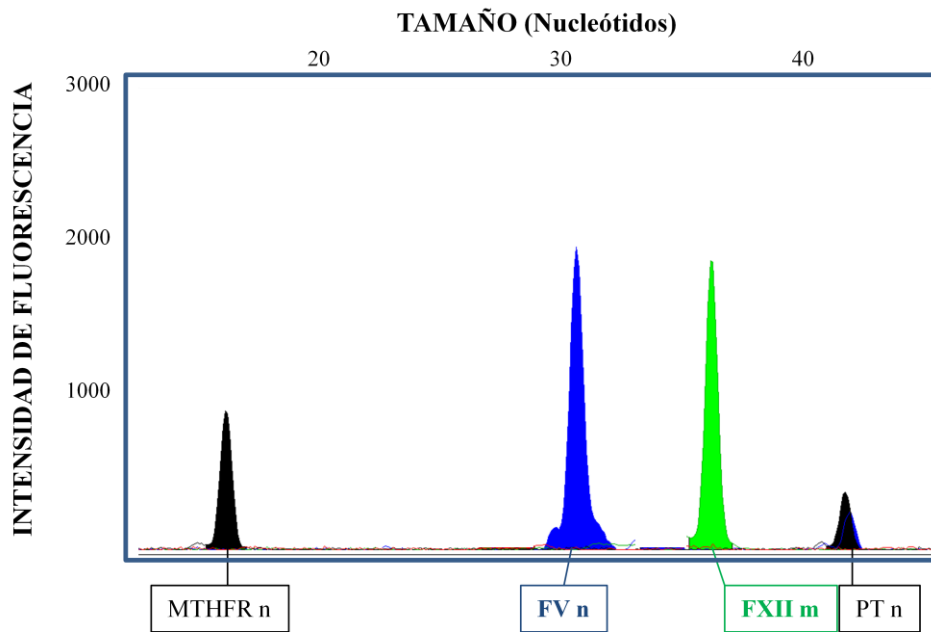


Figura 24. Electroforegrama correspondiente a un paciente homocigoto para la mutación C46T en el gen del Factor XII.

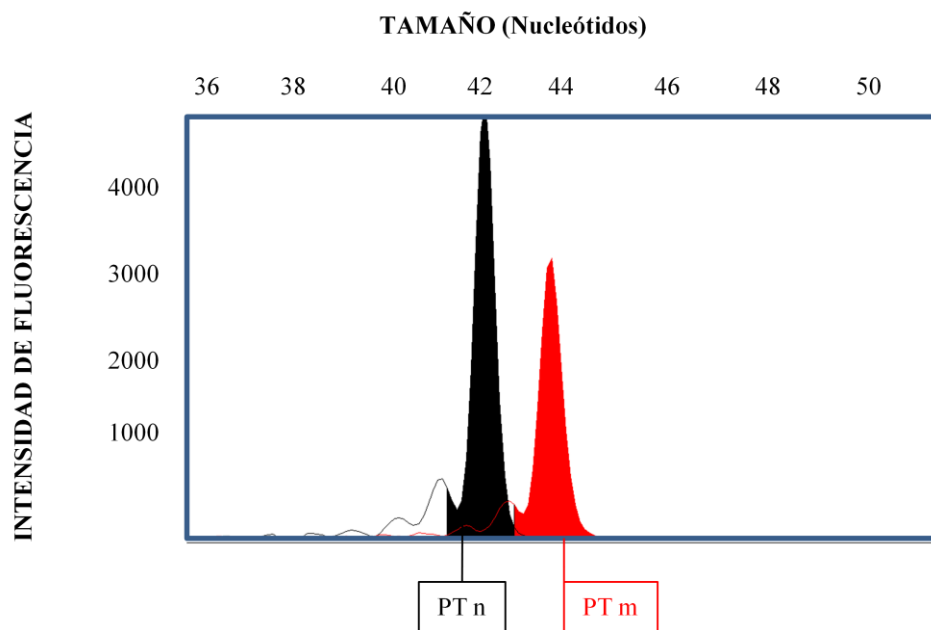


Figura 25. Electroforegrama correspondiente a un paciente heterocigoto para la mutación G20210A en el gen de la PT.

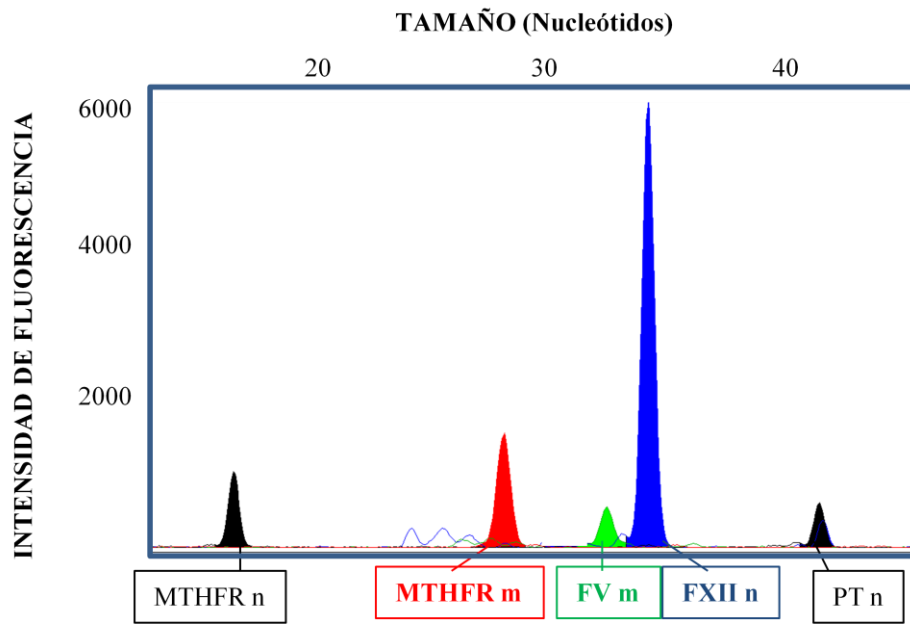


Figura 26. Electroforegrama correspondiente a un paciente heterocigoto para las mutación C677T y homocigoto para la mutación G1691A de los genes de la MTHFR y FV respectivamente.

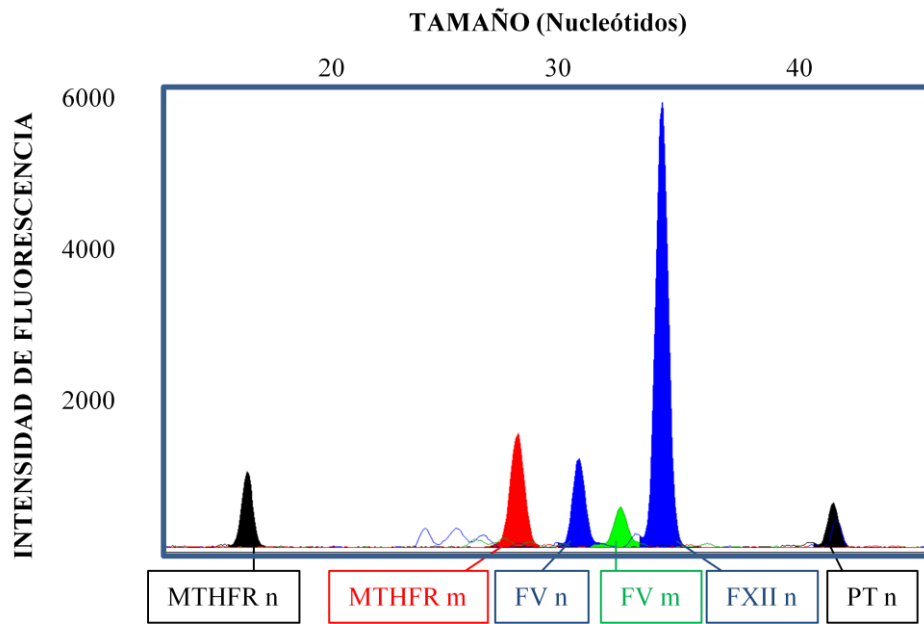


Figura 27. Electroforegrama correspondiente a un paciente heterocigoto para las mutaciones C677T y G1691A de los genes de la MTHFR y FV.

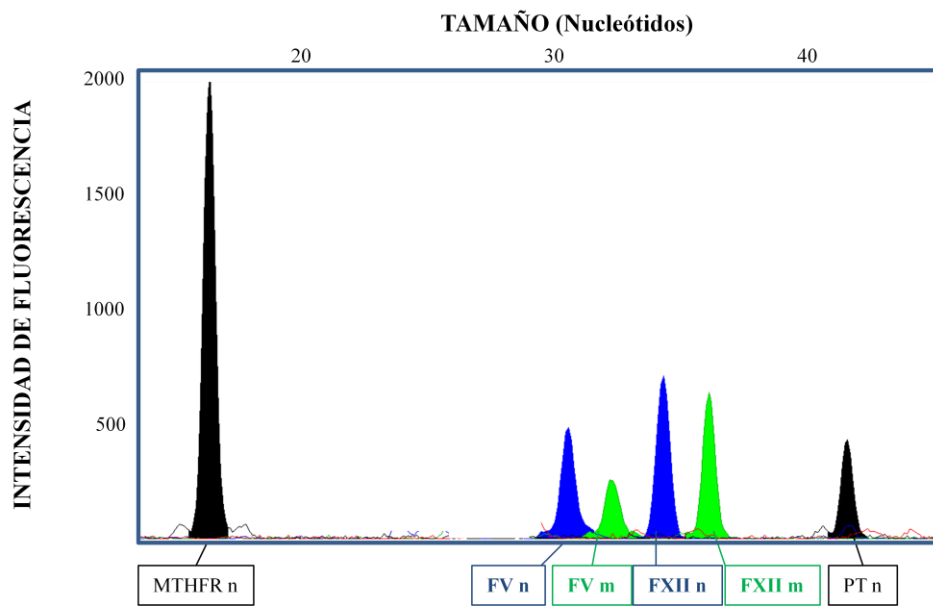


Figura 28. Electroforegrama correspondiente a un paciente heterocigoto para las mutaciones G1691A y C46T de los genes del FV y FXII

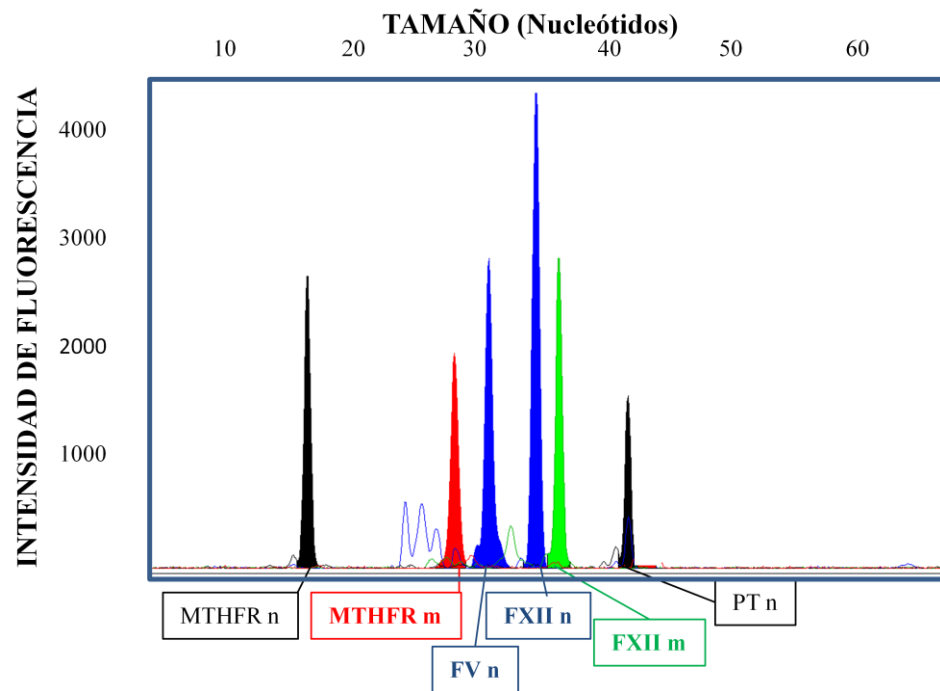


Figura 29. Electroforegrama correspondiente a un paciente heterocigoto para las mutaciones C677T yC46T de los genes de la MTHFR y F XII.

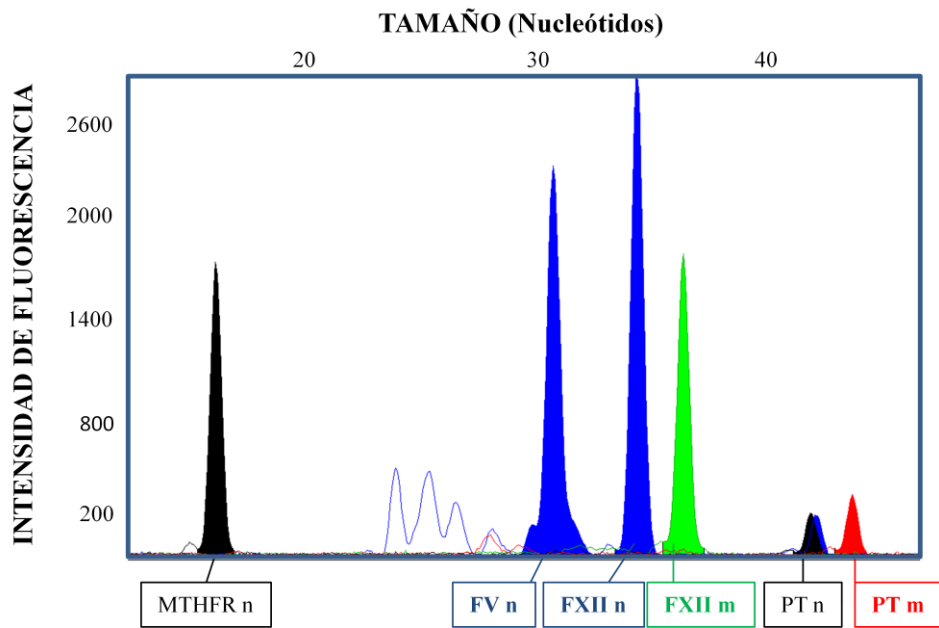


Figura 30. Electroforegrama correspondiente a un paciente heterocigoto para las mutaciones C46T y G20210A de los genes del FXII y de la PT.

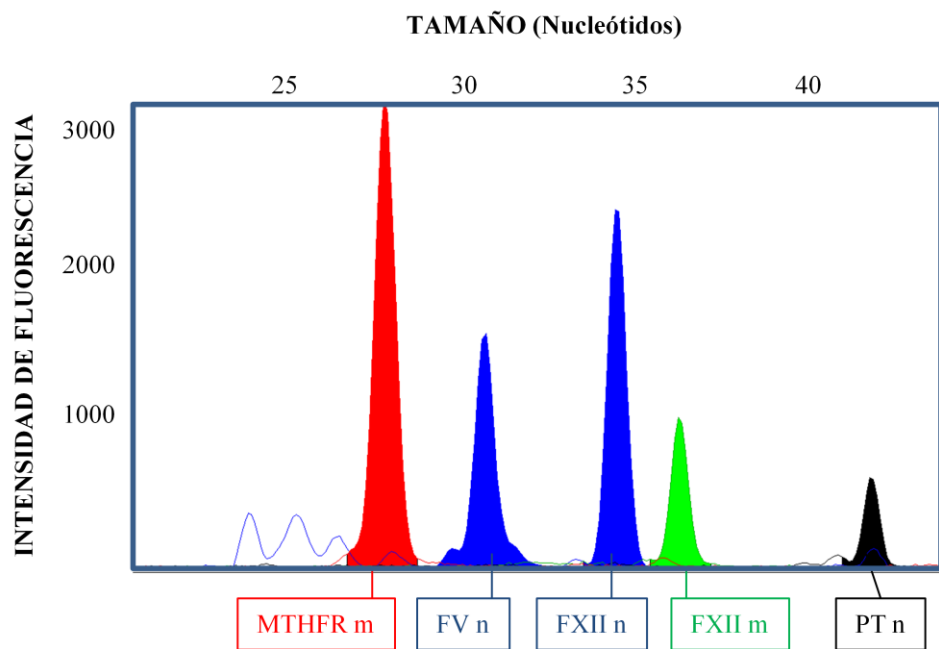


Figura 31. Electroforegrama correspondiente a un paciente homocigoto para la mutación C677T del gen de la MTHFR y heterocigoto para la mutación C46T del gen del FXII.

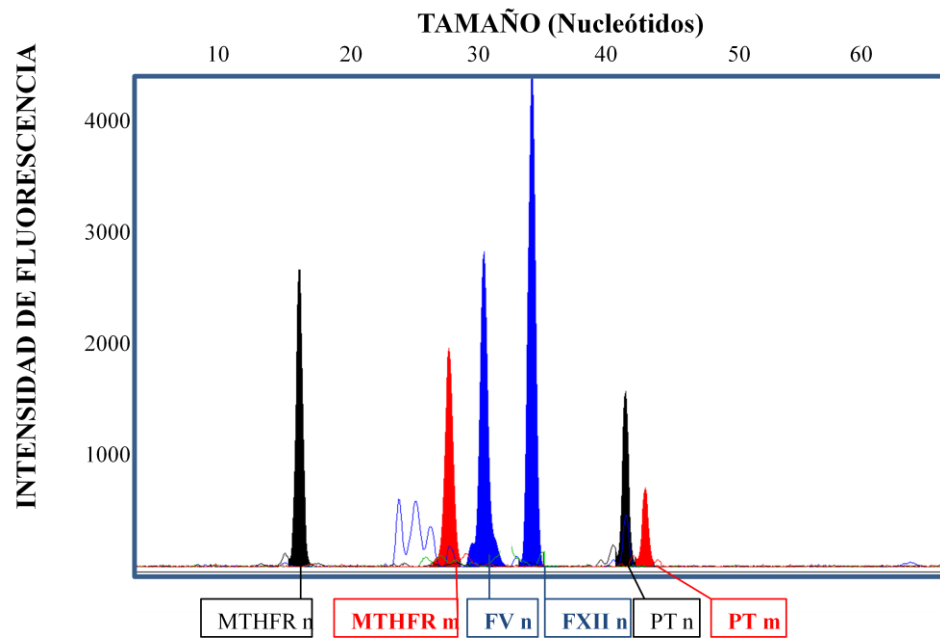


Figura 32. Electroforegrama correspondiente a un paciente heterocigoto para las mutaciones C677T y G20210A en los genes de la MTHFR y PT.

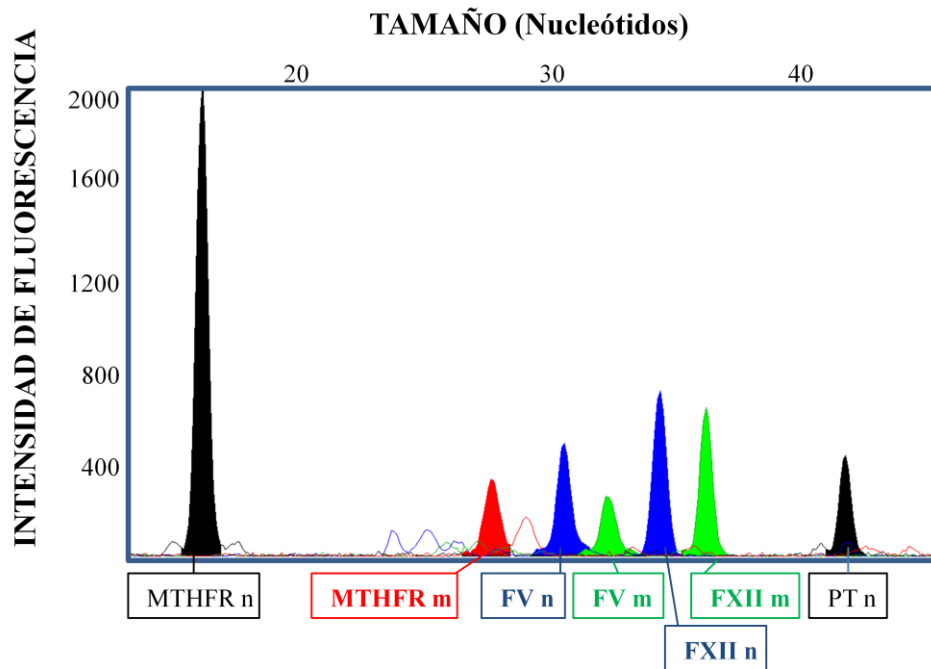


Figura 33. Electroforegrama correspondiente a un paciente heterocigoto para las mutaciones C677T, G1691A yC46T de los genes de la MTHFR, FV y FXII.

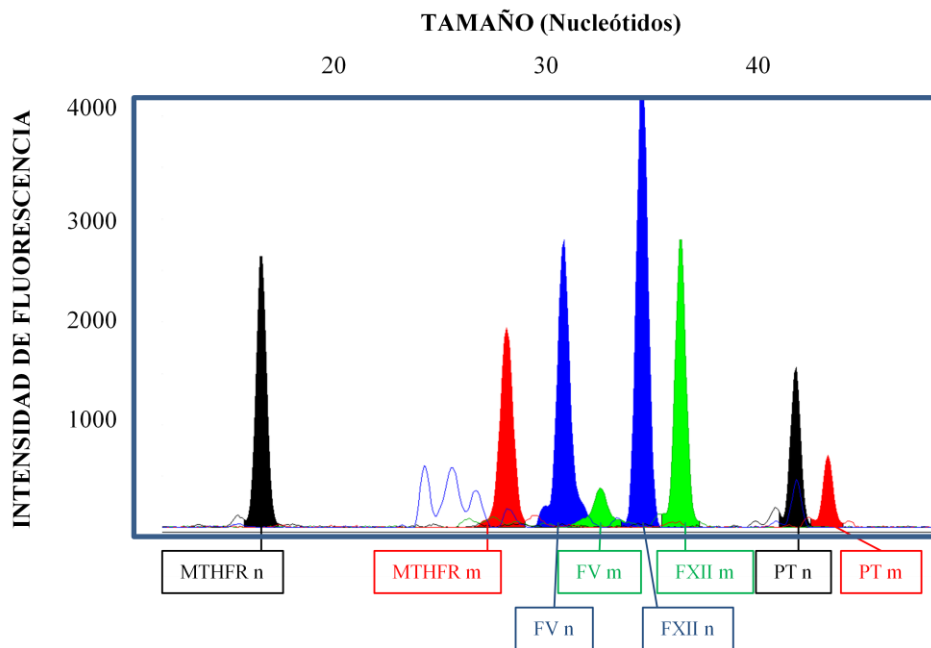


Figura 34. Electroforegrama de un paciente heterocigoto para todos los genes.

IV.2. RESULTADO DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS CON LA APLICACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS.

IV.2.1. Resultado del tratamiento estadístico en porcentaje de los distintos genotipos (homocigotos normales, homocigotos mutados y heterocigotos para cada uno de los genes PT, FV, MTHFR y FXII estudiados) en el total de los 1499 enfermos estudiados. (Figuras 35 a 38).

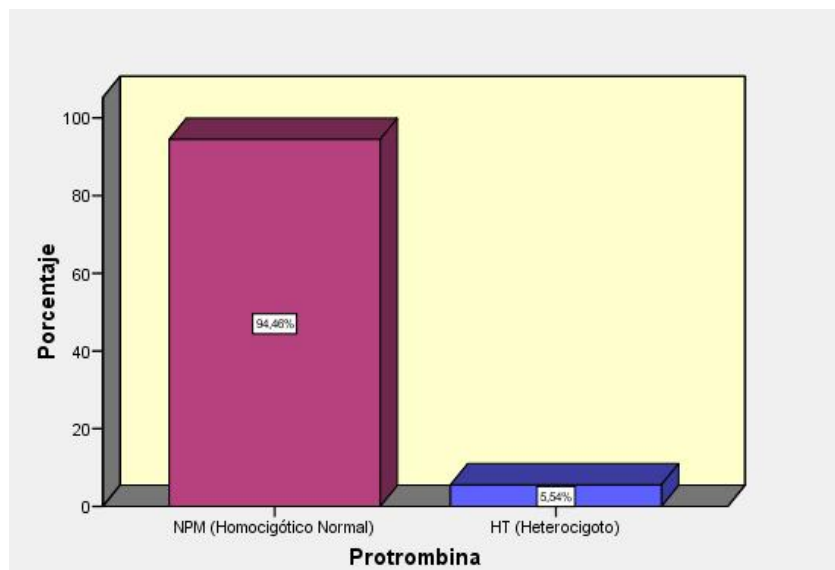


Figura 35. Frecuencia de presentación de las mutaciones del gen de la protrombina en los 1499 enfermos estudiados.

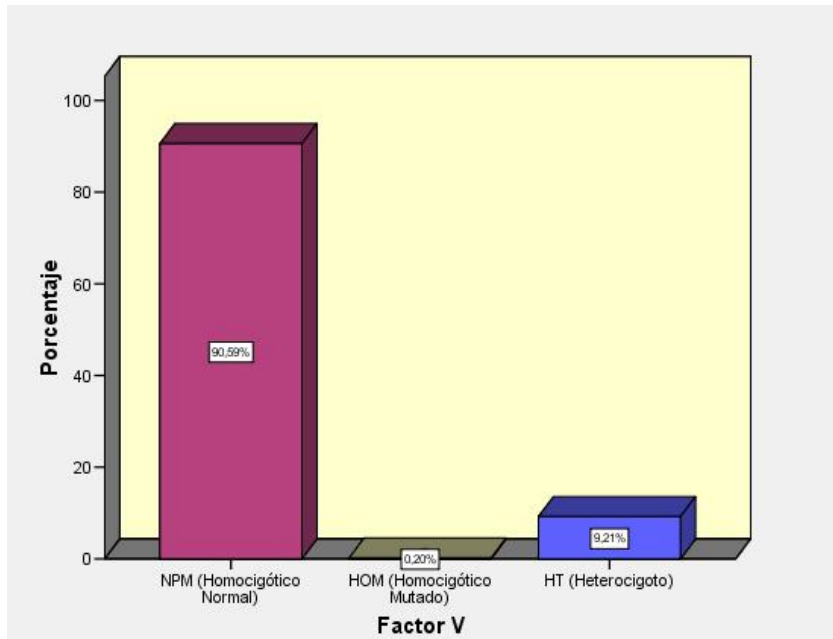


Figura 36. Frecuencia de presentación de las mutaciones del gen del Factor V en los 1499 enfermos estudiados.

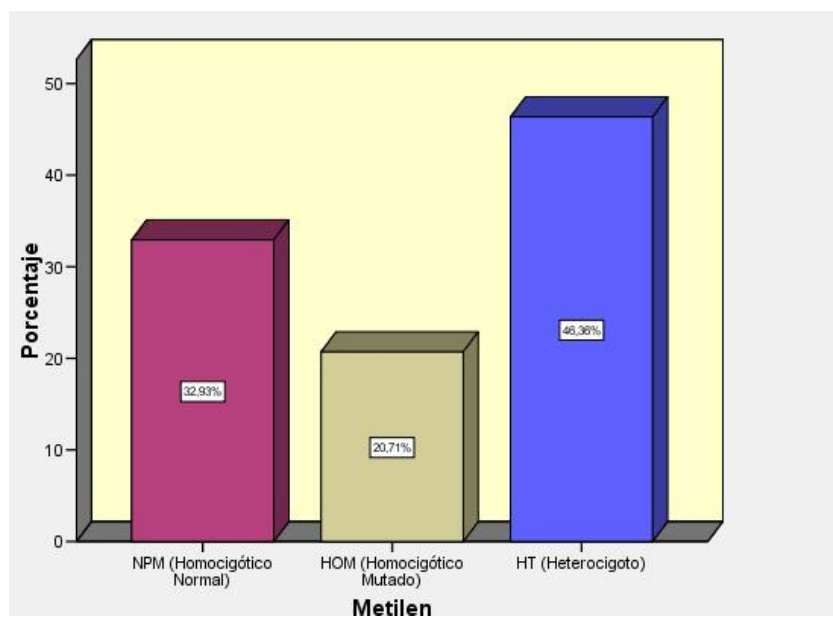


Figura 37. Frecuencia de presentación de las mutaciones del gen de la MTHFR en los 1499 enfermos estudiados.

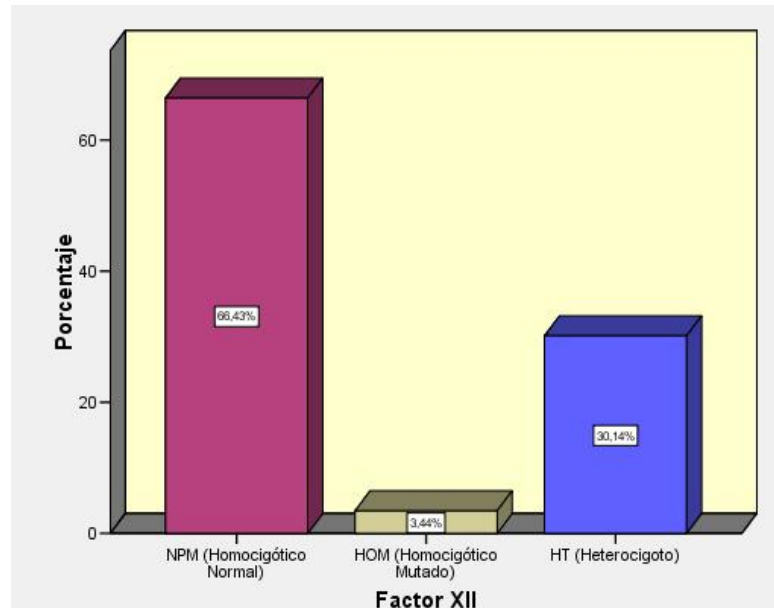


Figura 38. Frecuencia de presentación de las mutaciones del gen del Factor XII en los 1499 enfermos estudiados.

IV.2.2. Resultado del tratamiento estadístico en porcentaje y frecuencia de la comparación entre los distintos genotipos (homocigotos normales, homocigotos mutados y heterocigotos para el conjunto de todos los genes, PT, FV, MTHFR y FXII) en 1103 enfermos.

Para establecer la frecuencia y porcentaje de presentación de los diferentes genotipos (homocigotos normales, homocigotos mutados y heterocigotos para los genes, PT, FV, MTHFR y FXII) clasificamos las diferentes combinaciones de 1103 enfermos (que tienen realizadas las 4 determinaciones) en 35 grupos. (Tabla 9). Los grupos 9, 11 y 16 no aparecen en la tabla por no contar con ningún individuo.

Tabla 9 .Combinaciones en grupos de los distintos genotipos con su frecuencia y porcentaje.NPM: no presenta mutación; HT: heterocigoto; HOM: homocigoto.

Grupo	PT	FV	MTHFR	FXII	Frecuencia	Porcentaje
1	NPM	NPM	NPM	NPM	190	17.2
2	NPM	NPM	NPM	HOM	8	0.7
3	NPM	NPM	NPM	HT	103	9.3
4	NPM	NPM	HOM	NPM	134	12.1
5	NPM	NPM	HT	NPM	307	27.8
6	NPM	NPM	HOM	HOM	9	0.8
7	NPM	NPM	HT	HOM	14	1.3
8	NPM	NPM	HT	HT	118	10.7
10	NPM	HT	HT	HT	14	1.3
12	NPM	HT	HOM	HT	9	0.8
13	HT	NPM	NPM	NPM	12	1.1
14	HT	NPM	HT	NPM	17	1.5
15	HT	NPM	HOM	NPM	10	0.9
17	NPM	HT	HT	NPM	24	2.2
18	NPM	HT	NPM	HT	7	0.6
19	NPM	NPM	HOM	HT	68	6.2
20	NPM	HT	NPM	NPM	18	1.6
21	NPM	HT	HOM	NPM	14	1.3
22	HT	HT	HT	NPM	2	0.2
23	NPM	HT	NPM	HOM	2	0.2
24	HT	NPM	NPM	HT	7	0.6
25	HT	HOM	NPM	NPM	1	0.1

Grupo	PT	FV	MTHFR	FXII	Frecuencia	Porcentaje
26	NPM	HT	HT	HOM	3	0.3
27	HT	HT	NPM	NPM	1	0.1
28	HT	NPM	HT	HOM	1	0.1
29	HT	NPM	HT	HT	4	0.4
30	HT	HT	HOM	NPM	1	0.1
31	HT	NPM	HOM	HT	1	0.1
32	NPM	HOM	NPM	NPM	1	0.1
33	HT	NPM	HOM	HOM	1	0.1
34	HT	HT	HOM	HT	1	0.1
35	NPM	HOM	HT	NPM	1	0.1
Total					1103	100

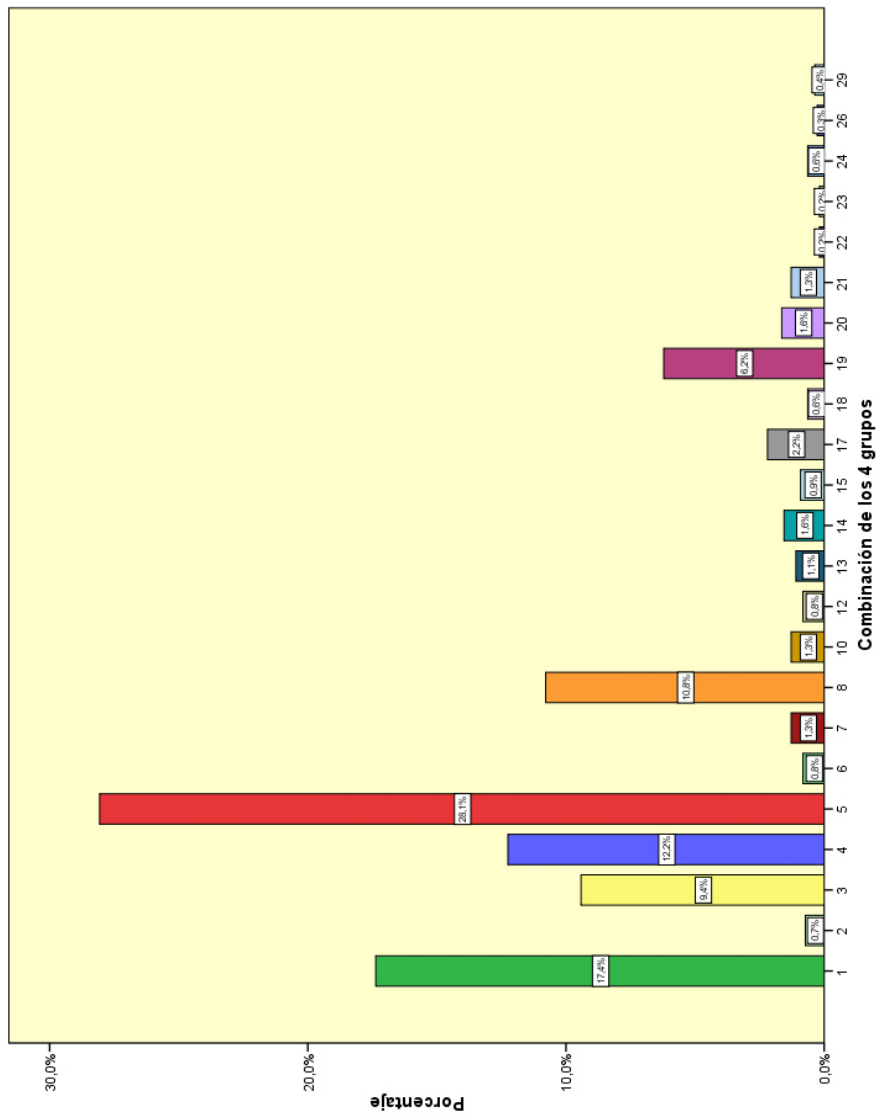


Figura 39. Frecuencia y porcentaje de presentación del conjunto de las mutaciones de los genes de la PT, FV, MTHFR y FXII en los 1103 enfermos divididos en 29 grupos. Los grupos 30 a 35 no aparecen en la gráfica debido a que solo cuentan con un paciente.

IV.2.3. Resultado del tratamiento estadístico en porcentaje de los distintos genotipos (homocigotos normales, homocigotos mutados y heterocigotos para cada uno de los genes PT, FV, MTHFR y FXII estudiados) del total de los 1499 enfermos estudiados en relación con el sexo. (Figuras 40 a 44)

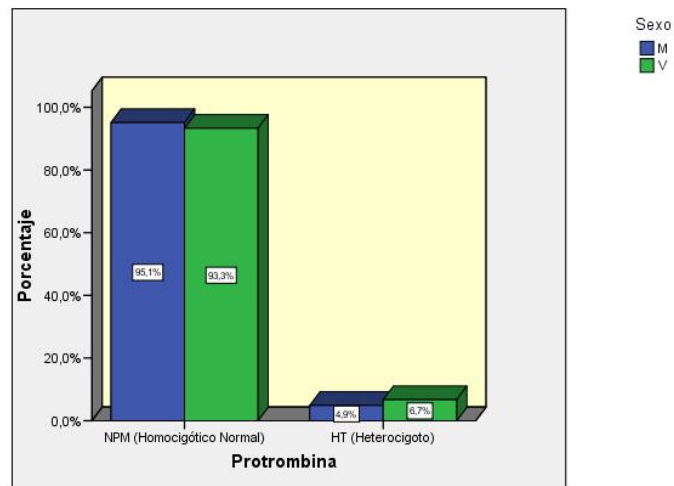


Figura 40. Frecuencia de presentación de las mutaciones del gen de la protrombina en los 1499 enfermos estudiados en relación con el sexo.

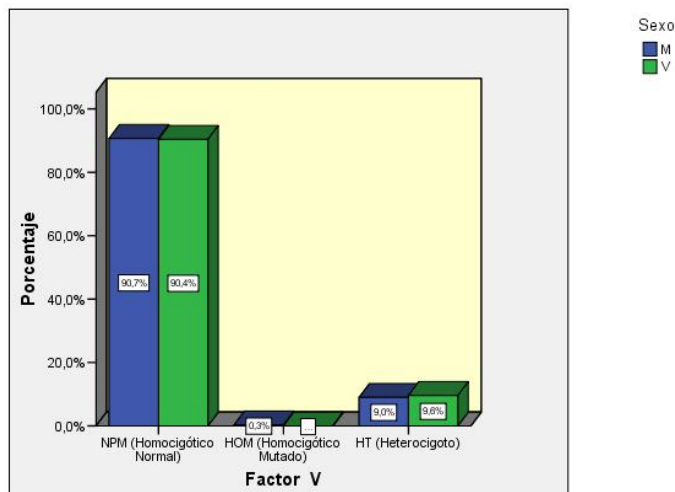


Figura 41. Frecuencia de presentación de las mutaciones del gen del Factor V en los 1499 enfermos estudiados en relación con el sexo.

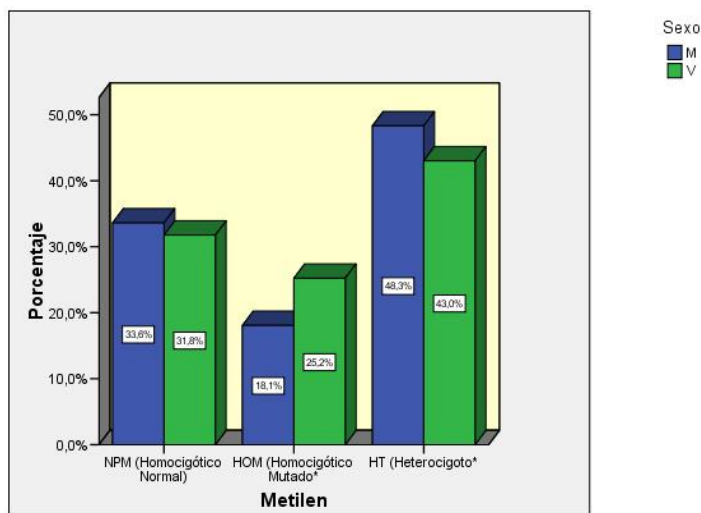


Figura 42. Frecuencia de presentación de las mutaciones del gen de la MTHFR en los 1499 enfermos estudiados en relación con el sexo.* Diferencia significativa $p < 0.05$.

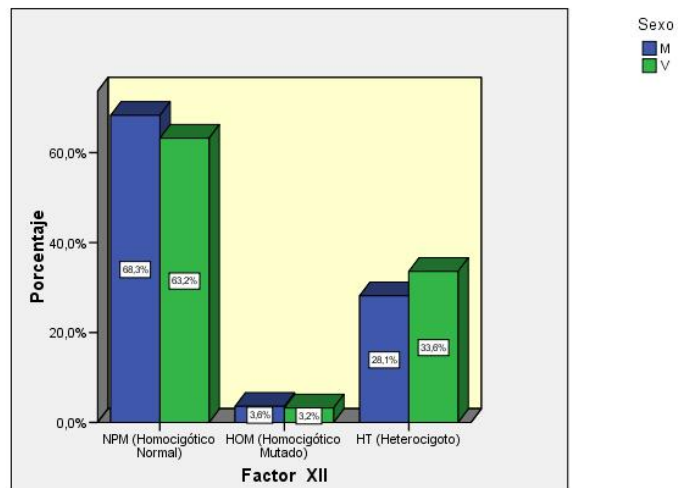


Figura 43. Frecuencia de presentación de las mutaciones del gen del Factor XII en los 1112 enfermos estudiados en relación con el sexo.

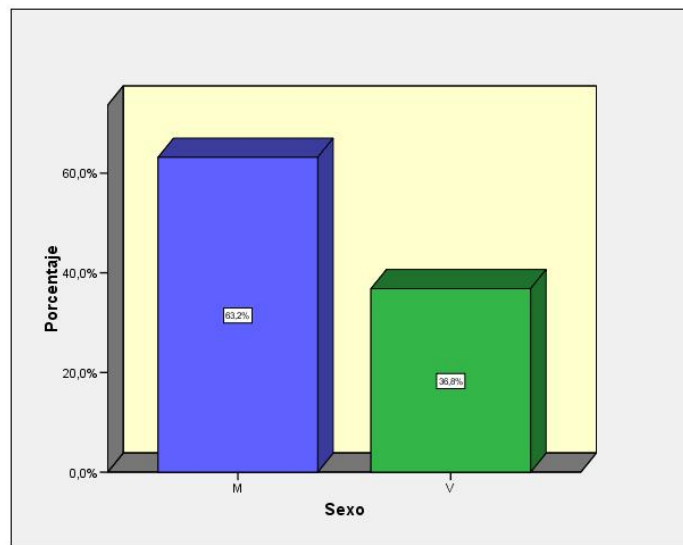


Figura 44. Porcentaje de mujeres (M) y de varones (V) de los 1499 pacientes estudiados.

IV.2.4. Resultado del tratamiento estadístico de los distintos genotipos (homocigotos normales (NPM), homocigotos mutados (HOM) y heterocigotos (HT) para cada uno de los genes PT, FV, MTHFR y FXII estudiados) en relación con las 21 pruebas de laboratorio (Material y Métodos III.4) para el diagnóstico de trombofilia en 931 pacientes.

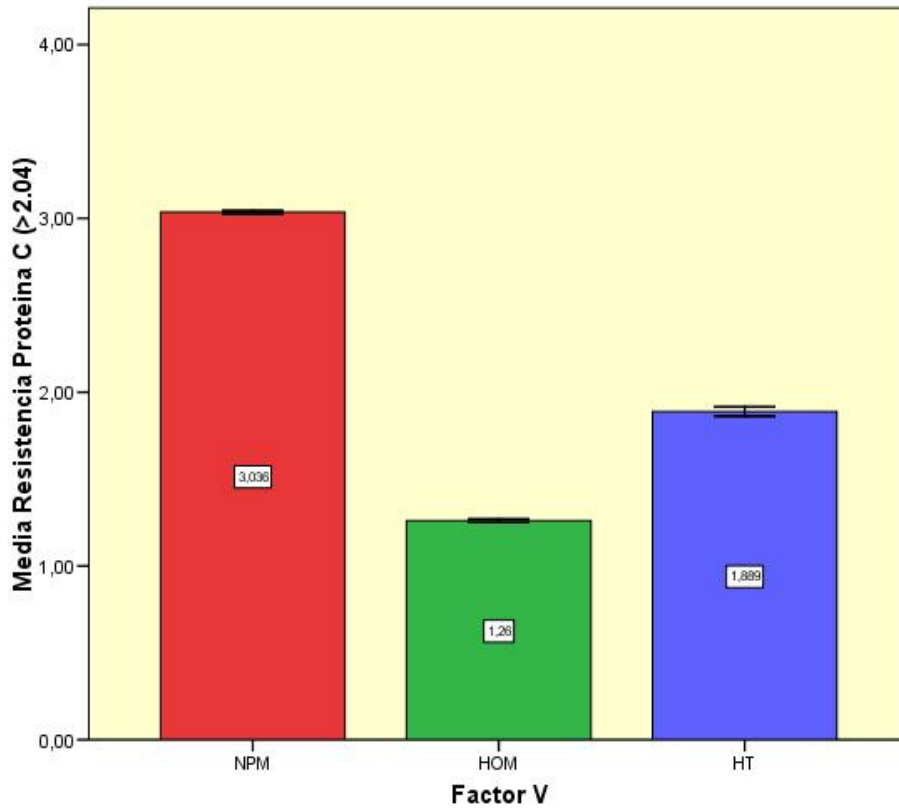


Figura 45. Valor de la Resistencia a la Proteína C +/- 1 ES para los distintos genotipos del Factor V. Significación: HOM vs HT $p < 0.001$. NPM vs HT $p < 0.000$. NPM vs HOM $p < 0.014$.

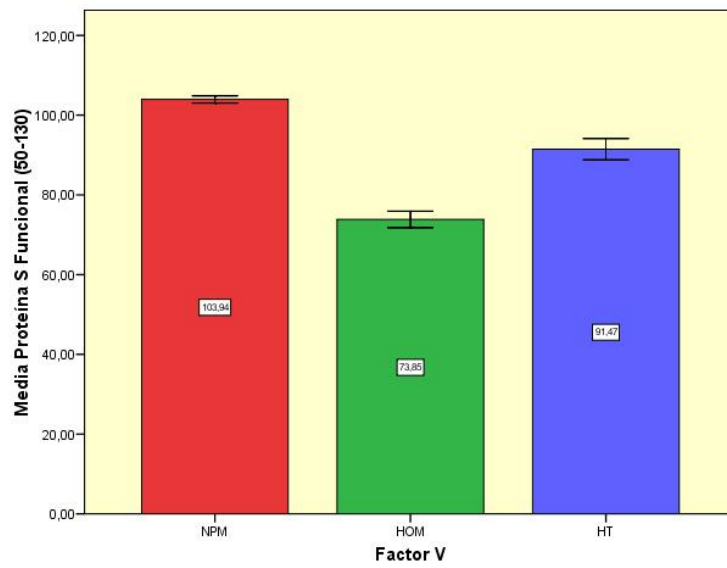


Figura 46. Valor de la Proteína S funcional +/- 1 SE para los distintos genotipos del Factor V. Significación: NPM vs HT $p < 0.000$. NPM vs HOM $p < 0.05$.

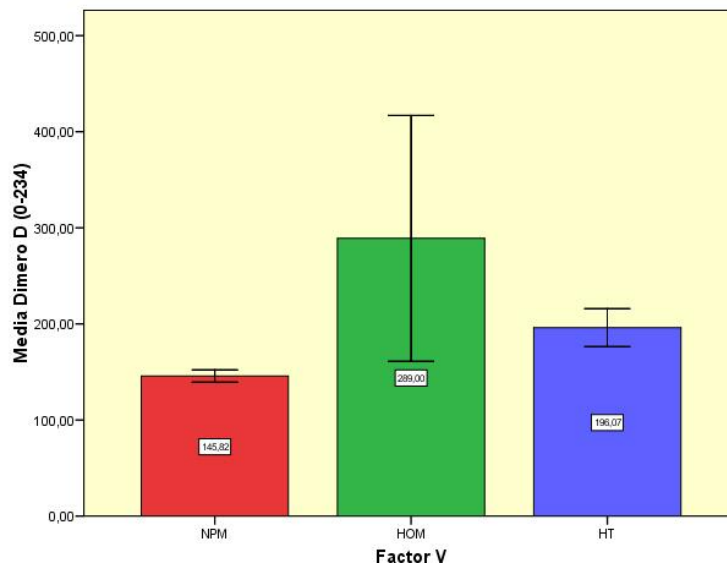


Figura 47. Valor del Dímero D +/- 1 SE para los distintos genotipos del Factor V. Significación: NPM vs HT $p < 0.02$.

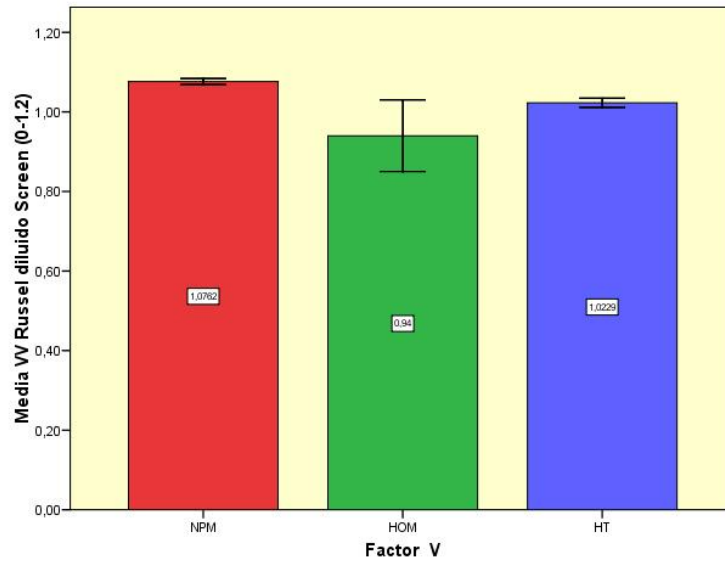


Figura 48. Valor del VV Russel +/- 1 SE para los distintos genotipos del Factor V. Significación: NPM vs HT $p < 0.007$.

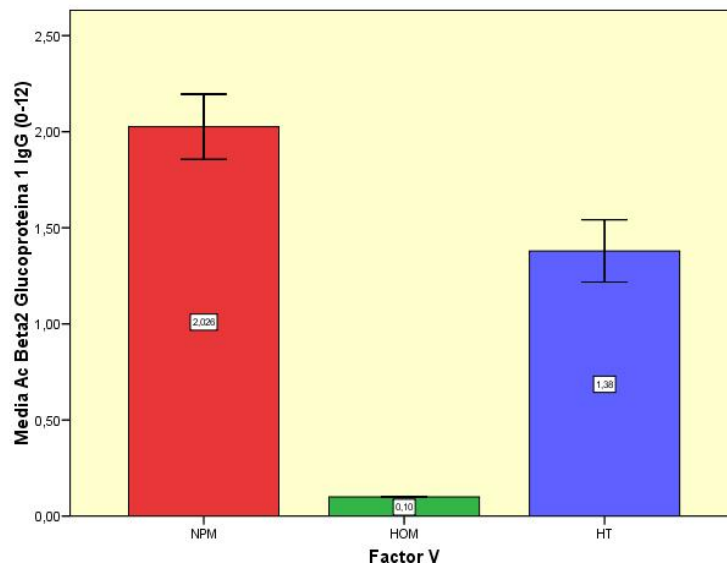


Figura 49. Valor de Ac β -2 Glucoproteína 1 IgG +/- 1 SE para los distintos genotipos del Factor V. Significación: NPM vs HOM $p < 0.047$.

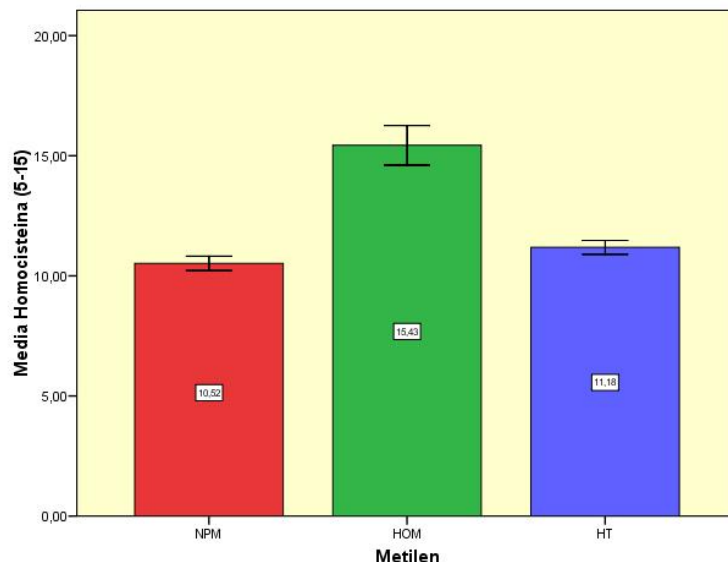


Figura 50. Valor de Homocisteína +/- 1 SE para los distintos genotipos de MTHFR. Significación: HOM vs HT $p < 0.000$; NPM vs HOM $p < 0.000$.

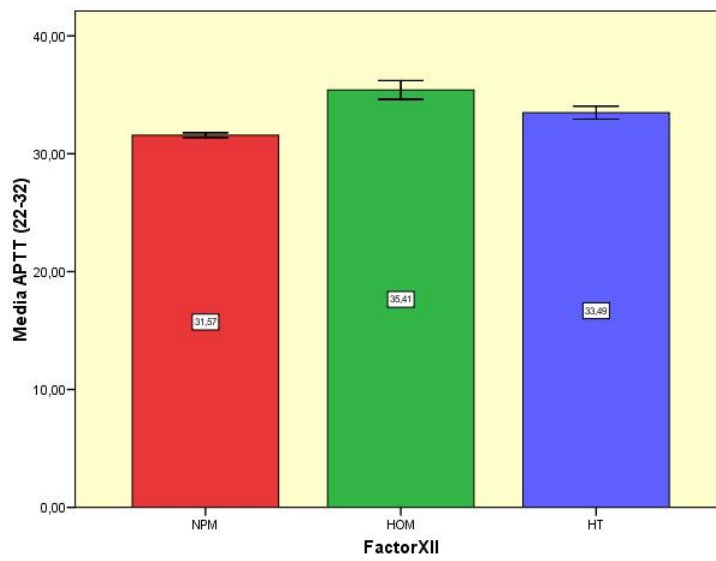


Figura 51. Valor de APTT +/- 1 SE para los distintos genotipos de FXII. Significación: HOM vs HT $p < 0.02$; NPM vs HOM $p < 0.000$. NPM vs HT $p < 0.000$.

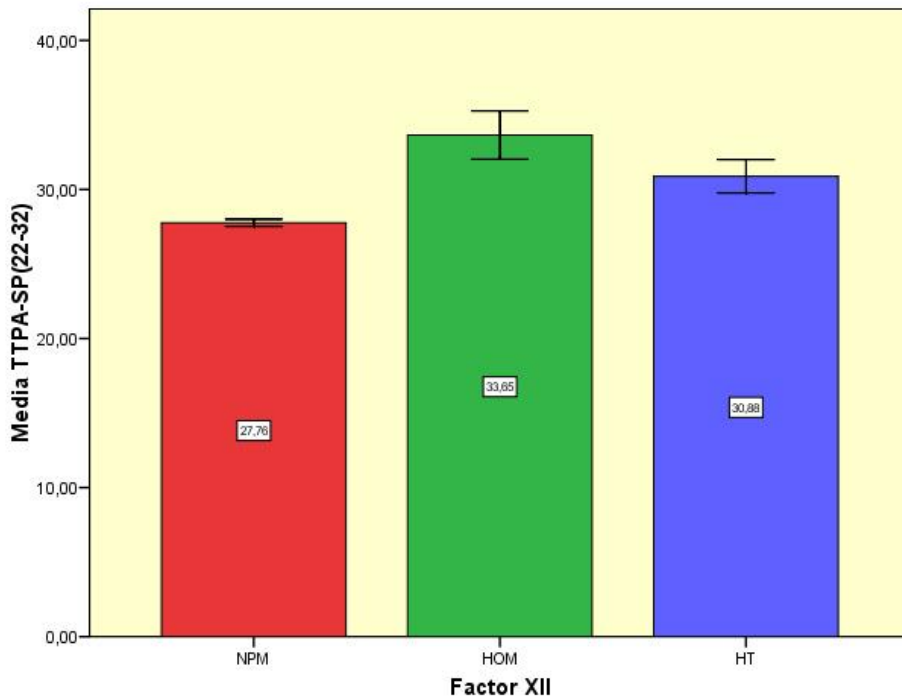


Figura 52. Valor de TTPA-SP \pm 1 SE para los distintos genotipos de FXII
Significación: HOM vs HT $p < 0.001$; NPM vs HOM $p < 0.000$. NPM vs HT $p < 0.000$.

IV.2.4. Resultado del tratamiento estadístico de la combinación entre los distintos genotipos (homocigotos normales (NPM), homocigotos mutados (HOM) y heterocigotos (HT) para los genes PT, FV y MTHFR) y las 21 pruebas de laboratorio (Material y Métodos III.4) para el diagnóstico de trombofilia en 931 pacientes.

Para relacionar los resultados obtenidos en los parámetros del “Estudio de Trombofilia” realizado en el Laboratorio de Análisis Clínicos con los genotipos encontrados tras la aplicación de nuestro método de análisis dividimos las distintas combinaciones de estos genotipos en 14 grupos dejando fuera los genotipos del Factor XII.

Tabla 10. Grupos correspondientes a las combinaciones más frecuentes entre los genotipos encontrados. (NPM: no presenta mutación, HOM: homocigoto, HT: heterocigoto)

GRUPO	PROTROMBINA	FACTOR V	MTHFR
1	NPM	NPM	NPM
2	NPM	NPM	HOM
3	NPM	NPM	HT
4	NPM	HT	NPM
5	NPM	HT	HOM
6	HT	NPM	NPM
7	NPM	HT	HT
8	HT	NPM	HT
9	HT	HT	NPM
10	HT	NPM	HOM
11	NPM	HOM	NPM
12	HT	HT	HOM
13	NPM	HOM	HT
14	HT	HT	HT

En las tablas 11, 12, 13 y 14 se muestran las medias de los distintos parámetros de laboratorio estudiados para cada uno de los grupos.

Tabla 11.

Grupo	Actividad Protrombina (70-130)	Tiempo Trombina (13-22)	INR (0.8-1.2)	Fibrinógeno (180-400)	Dímero D (0-234)	F VIII (50-120)
1	109.09	14.54	0.97	334.55	142.22	129.40
2	109.01	14.85	0.96	321.79	115.48	126.66
3	110.06	14.51	0.97	331.94	164.18	132.20
4	112.10	14.66	0.94	336.95	143.89	131.09
5	107.16	14.12	1.4	348.84	234.07	130.91
6	101.88	14.36	1.01	310.25	103.12	129.55
7	108.11	14.76	0.96	321.92	209.24	135.92
8	109.06	15.04	0.96	298.47	107	140.59
9	102.75	14.10	0.99	339	132.75	156.43
10	114	14.49	0.93	335.96	211.43	146.29
11	93	15.10	1.04	281	417	171.80
12	111	14.80	0.93	288	188	223.90
13	120	14.90	0.91	249	161	164.30
14	109.32	14.76	0.98	300.80	109.80	132.08

Tabla 12.

Grupo	APTT (22-32)	ATIII funcional (80-120)	Proteína C Funcional (50-130)	Proteína S Funcional (50-130)	VV Russel (0-1.2)	Resistencia Proteína C (>2.04)
1	31.69	105.63	112.08	102.24	1.08	3.06
2	31.97	105.57	111.68	104.83	1.06	3.02
3	31.54	105.45	110.27	105.04	1.07	3.06
4	31.09	107.89	112.10	100.11	1.02	1.86
5	30.66	101.44	109.89	83.04	1	1.82
6	35.33	103.53	113.69	97.16	1.25	2.91
7	31.66	102.70	111.36	90.46	1.02	1.88
8	32.10	107.53	116.88	107.26	1.02	2.91
9	28.07	119	99.25	91.12	1.07	2.32
10	30.51	104.71	116.28	97.49	1.03	3.06
11	30.90	100	107	75.90	1.03	1.25
12	32.10	80	109	116	0.99	1.93
13	30.30	85	100	71.80	0.85	1.27
14	30.50	102.40	112	93.32	1.05	1.99

Tabla 13.

Grupo	Homocisteína (5-15)	TTPA-SP (22-32)	Plasminógeno (76-126)	Ac. Anticardiolipina IgM (0-12)
1	10.36	28.97	99.17	2.51
2	15.79	28.60	99.54	2.63
3	11.15	28.34	100.44	2.87
4	11.94	28.69	101.21	2.28
5	12.56	26.98	101.56	3.24
6	11.79	40.20	100	7.01
7	10.84	29.86	99.51	2.14
8	13.55	29.68	100.71	3.57
9	9	26.43	94	1.78
10	9.68	27.36	103.29	1.56
11	8.40	29.50	96	3
12	51	24.30	105	1.7
13	6	25.80	89	1.4
14	9.66	26.86	106.40	1.02

Tabla 14.

Grupo	Ac. Anticardiolipina IgG (0-12)	Ac β 2 Glucoproteína 1 Ig M (0-7)	Ac β 2 Glucoproteína 1 Ig M (0-7)	Alfa 2 antiplasmina (80-120)
1	4.63	1.48	2.08	110.91
2	3.82	1.64	1.65	111
3	3.99	1.69	1.79	110.33
4	2.28	0.81	1	108.63
5	2.55	1.94	1.28	109.50
6	17.43	7.49	10.41	105.25
7	3.22	1.90	1.57	113.22
8	4.98	2.04	2.58	110.24
9	3.55	1.58	2.33	101
10	3.70	0.61	0.77	105.86
11	1.80	1.90	0.10	106
12	1.20	1.60	0.10	120
13	0.70	0.70	0.10	111
14	1.82	1.26	1.40	119

Debido a que los grupos 11, 12 y 13 sólo cuentan con un individuo se dejan fuera en la comparación realizada entre los grupos restantes (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 14 con 365, 164, 371, 19, 19, 16, 37, 17, 4, 7 y 5 pacientes respectivamente) y los parámetros de laboratorio encontrándose diferencias significativas para un nivel de significación de $p < 0.001$ en 7 de estos parámetros (Dímero D, Proteína S, Resistencia a la proteína C, Homocisteína, Ac β 2 Glucoproteína IgG, Ac β 2 Glucoproteína IgM y TTPA-SP) tal y como se muestra en las figuras 53 a 59.

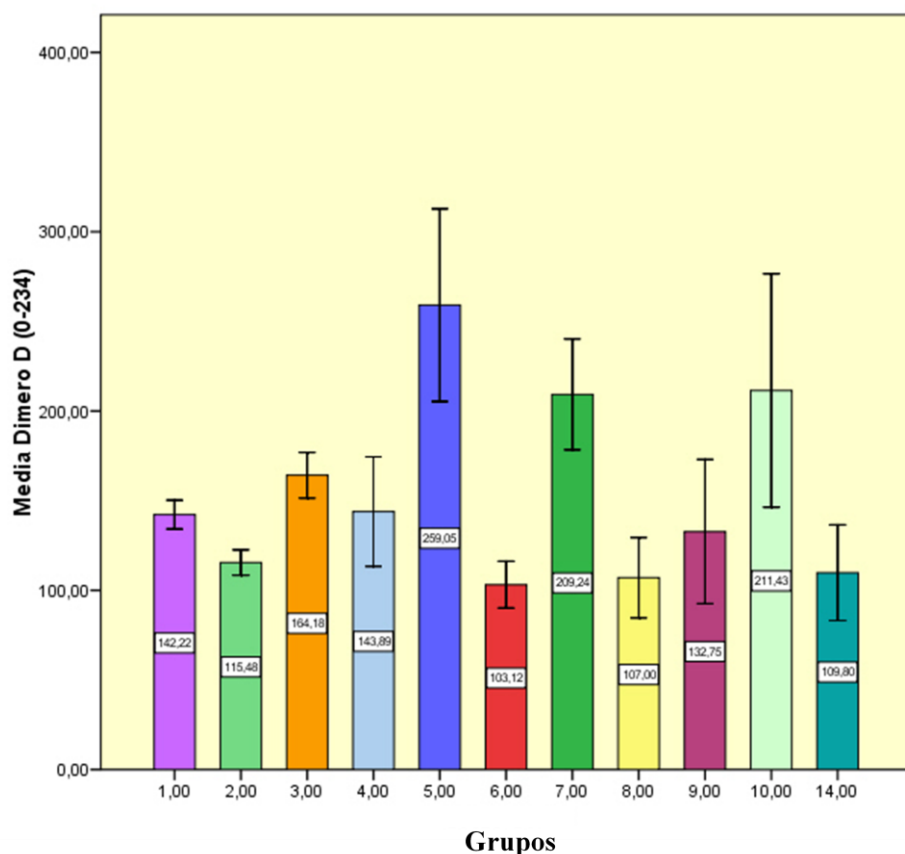
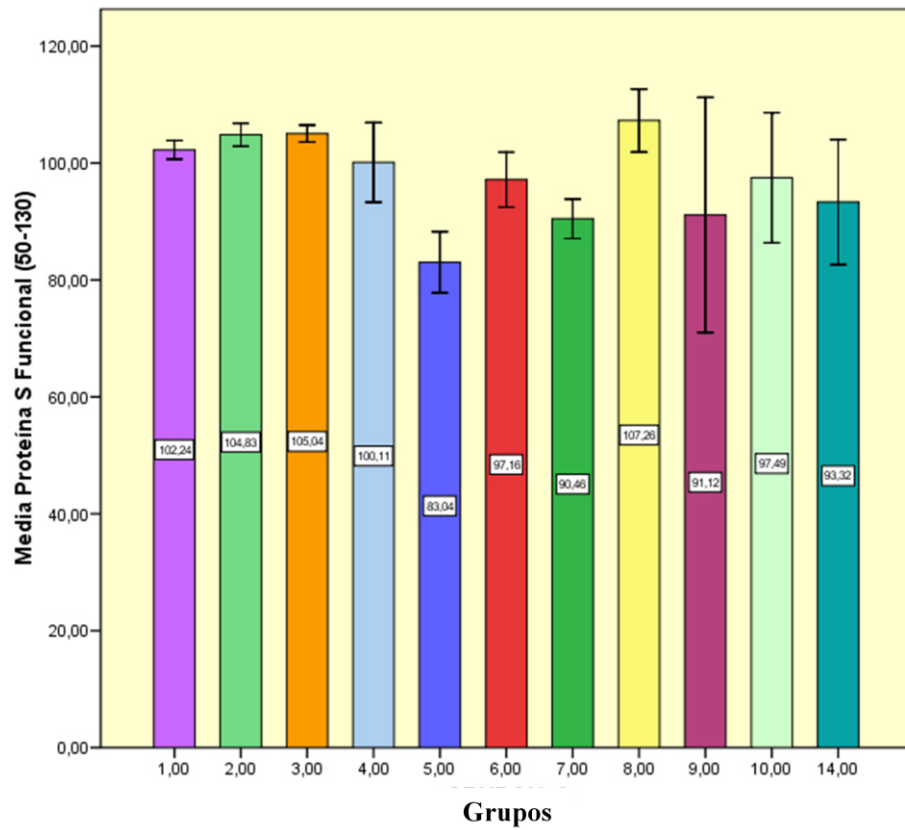
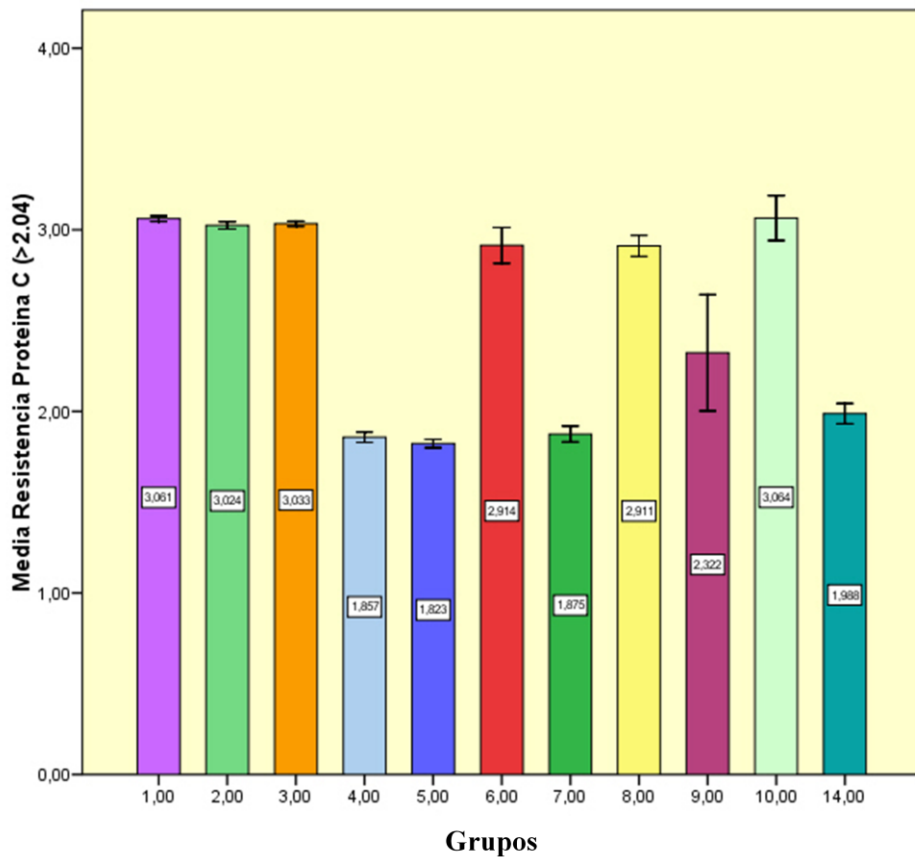


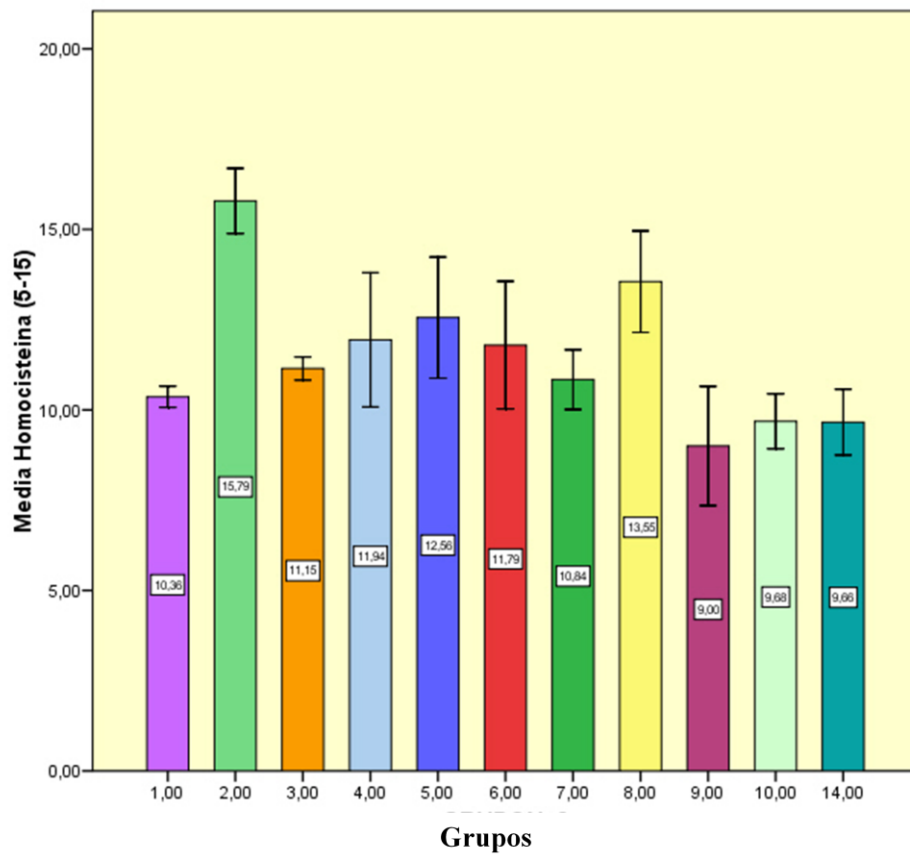
Figura 53. Valor del Dímero D \pm 1 SE en los distintos grupos correspondientes a las combinaciones entre los genotipos encontrados (Tabla 10). Significación: Grupo 1 vs grupo 5 $p < 0.008$; Grupo 2 vs Grupo 5 $p < 0.002$; Grupo 5 vs Grupo 8 $p < 0.008$.



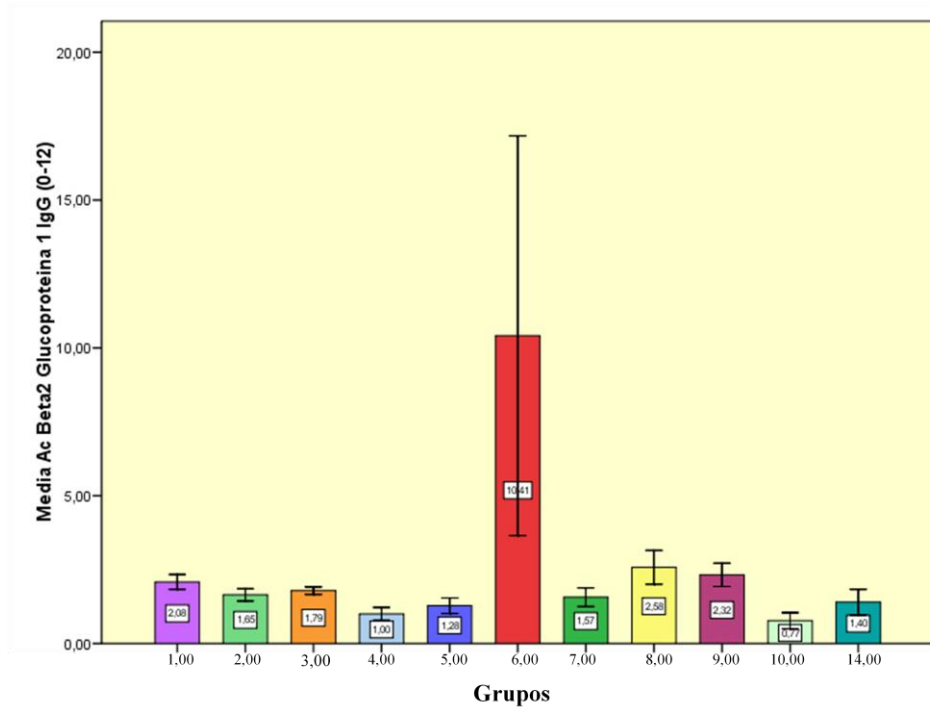
Gráfica 54. Valor de la Proteína S Funcional +/- 1 SE en los distintos grupos correspondientes a las combinaciones entre los genotipos encontrados (Tabla 10). Significación: Grupo 1 vs Grupo 5 $p < 0.001$; Grupo 1 vs Grupo 7 $p < 0.008$; Grupo 2 vs Grupo 5 $p < 0.000$; Grupo 2 vs Grupo 7 $p < 0.001$; Grupo 3 vs Grupo 5 $p < 0.001$; Grupo 3 vs Grupo 7 $p < 0.001$; Grupo 5 vs Grupo 8 $p < 0.003$.



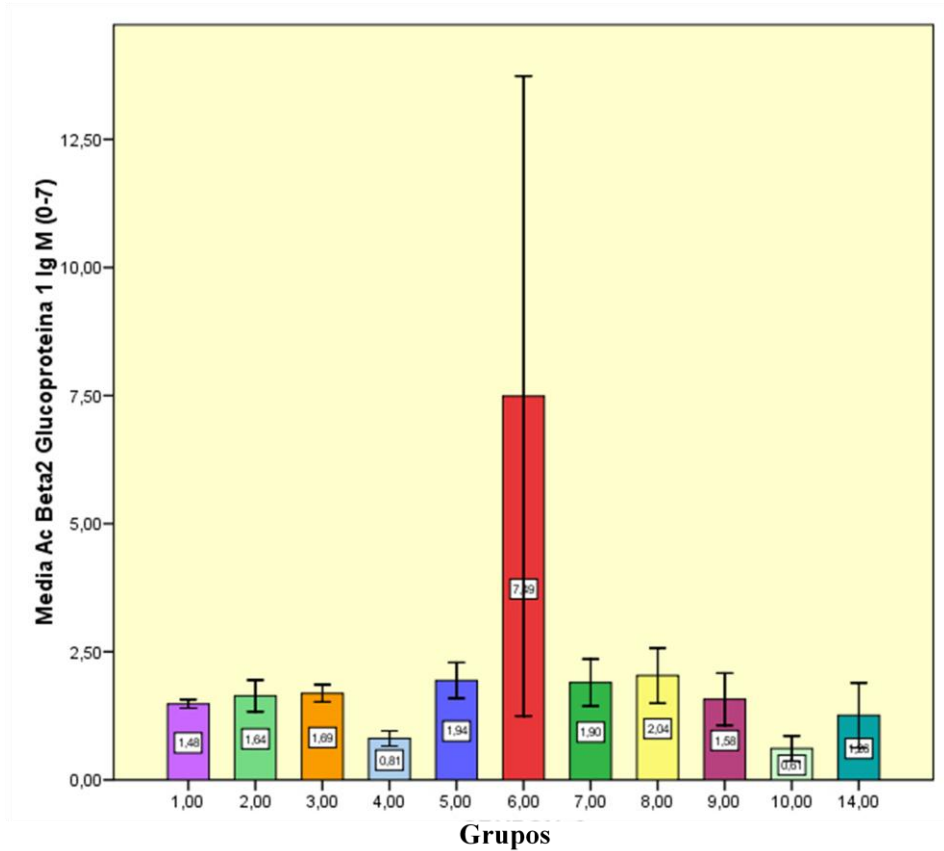
Gráfica 55. Valor de la Resistencia a la Proteína C \pm 1 SE en los distintos grupos correspondientes a las combinaciones entre los genotipos encontrados (Tabla 10). Significación: Grupo 1 vs Grupo 4 $p < 0.000$; Grupo 1 vs Grupo 5 $p < 0.000$; Grupo 1 vs Grupo 7 $p < 0.000$; Grupo 1 vs Grupo 14 $p < 0.000$; Grupo 2 vs Grupo 5 $p < 0.000$; Grupo 2 vs Grupo 14 $p < 0.000$; Grupo 3 vs Grupo 4 $p < 0.000$; Grupo 3 vs Grupo 5 $p < 0.000$; Grupo 3 vs Grupo 7 $p < 0.000$; Grupo 3 vs Grupo 14 $p < 0.000$; Grupo 4 vs Grupo 6 $p < 0.000$; Grupo 4 vs Grupo 8 $p < 0.000$; Grupo 4 vs Grupo 10 $p < 0.000$; Grupo 4 vs Grupo 14 $p < 0.000$; Grupo 5 vs Grupo 6 $p < 0.000$; Grupo 5 vs Grupo 7 $p < 0.000$; Grupo 5 vs Grupo 8 $p < 0.000$; Grupo 5 vs Grupo 10 $p < 0.000$.



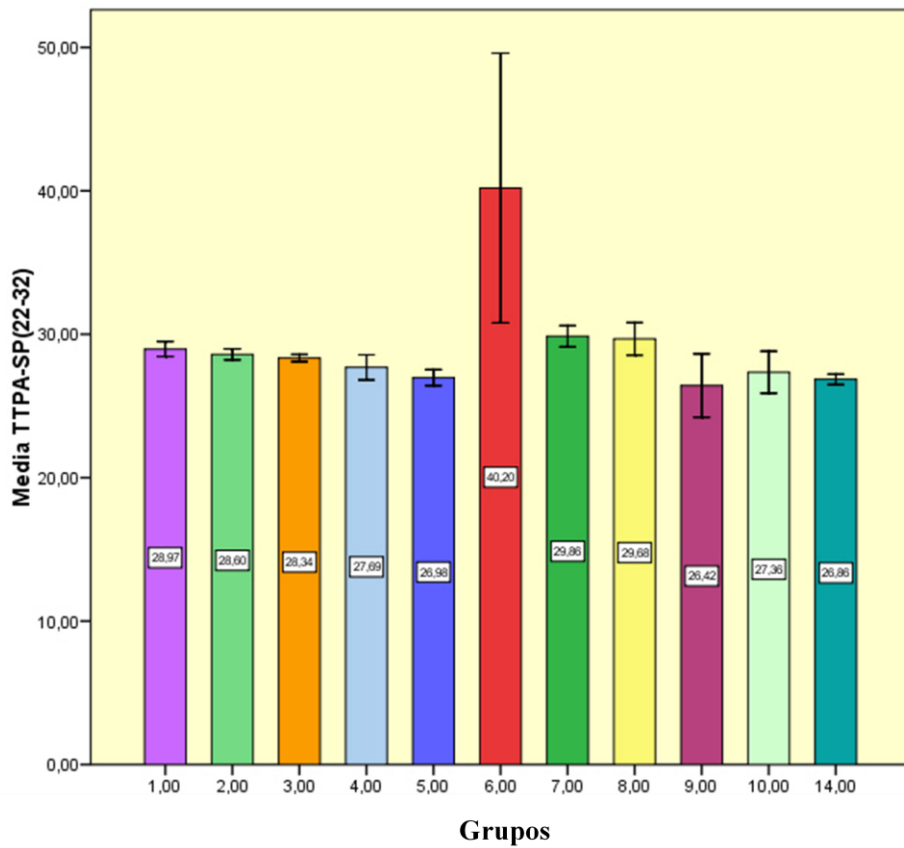
Gráfica 56. Valor de la Homocisteína +/- 1 SE en los distintos grupos correspondientes a las combinaciones entre los genotipos encontrados (Tabla 10). Significación: Grupo 1 vs Grupo 2 $p < 0.000$; Grupo 2 vs Grupo 3 $p < 0.000$.



Gráfica 57. Valor de Ac β 2 Glucoproteína IgG \pm 1 SE en los distintos grupos correspondientes a las combinaciones entre los genotipos encontrados (Tabla 10). Significación: Grupo 4 vs Grupo 8 $p < 0.006$.



Gráfica 58. Valor de Ac β 2 Glucoproteína IgM \pm 1 SE en los distintos grupos correspondientes a las combinaciones entre los genotipos encontrados (Tabla 10).Significación: Grupo 4 vs Grupo 5 $p < 0.007$.



Gráfica 59. Valor de TTPA-SP \pm 1 SE en los distintos grupos correspondientes a las combinaciones entre los genotipos encontrados (Tabla 10). Significación: Grupo 3 vs Grupo 7 $p < 0.006$. Grupo 5 vs Grupo 7 $p < 0.003$.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Los rápidos avances que se están consiguiendo en la comprensión de la vida a nivel molecular están cambiando la medicina en muchos aspectos.

En la actualidad es posible conocer las diferencias entre la secuencia de DNA de un gen normal y la secuencia de DNA alterada responsable de una enfermedad, lo que ha permitido diseñar pruebas que puedan detectar estas diferencias y así diagnosticar a nivel molecular la enfermedad.

Se admite hoy en día que la mayoría de las enfermedades tienen una causa molecular. Cualquier enfermedad cursa en mayor o menor medida con alteraciones en la estructura, propiedades, metabolismo o función de las biomoléculas; de ahí que un estudio moderno de la enfermedad requiera la consideración de los aspectos moleculares que acompañan a las observaciones clínicas. Las clasificaciones clínicas se basan en el diagnóstico a partir de la observación médica (exploración) con el apoyo de los datos del laboratorio. Las clasificaciones moleculares, o el estudio de la enfermedad bajo un enfoque molecular, se basan exclusivamente en criterios genotípicos. Los polimorfismos de un único nucleótido (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) son las variaciones más frecuentes en la secuencia del DNA, ganando cada vez más importancia en las aplicaciones biológicas y biomédicas. Pueden afectar tanto a regiones codificantes del genoma como no codificantes. Los SNPs ocurren en un rango de 1.3 Kb en el genoma humano, y son fundamentalmente bi-alélicos (*Smigielski EM et al., 2000; Venter JC et al., 2001*).

Estas alteraciones del genoma, en algunos casos, son responsables de determinadas enfermedades como es el caso de las trombofilias hereditarias o congénitas.

Se han descrito una gran variedad de métodos para el diagnóstico de las mutaciones relacionadas con la trombofilia. La mayor parte de los estudios para el diagnóstico molecular están basados en la amplificación de la región específica por PCR, seguido de la detección de la mutación. Se pueden destacar los siguientes:

1. *Análisis de polimorfismos de conformación de una sola hebra (SSCP).* Es una técnica usada para la identificación de nuevas mutaciones y de diferencias genéticas. Se amplifica mediante PCR un fragmento de entre 200 y 300 bases del DNA genómico, se desnatura y se corre en un gel de acrilamida. Las hebras de DNA presentarán una estructura secundaria de acuerdo con su secuencia nucleotídica, así, el cambio de la secuencia de DNA producirá una estructura secundaria diferente, que resultará en una movilidad electroforética distinta (*Orita et al., 1989*).
2. *Análisis mediante enzimas de restricción.* Se trata probablemente del método más utilizado puesto que la importancia de estas enzimas radica en su gran especificidad de reconocimiento de una secuencia corta de DNA dúplex y la consiguiente hidrólisis de un enlace fosfodiéster en cada hebra, justamente en secuencias concretas del DNA llamadas sitios de reconocimiento o de restricción. Las posibles mutaciones crearán un sitio de restricción y la enzima cortará el alelo que contiene la mutación dejando intacto el alelo salvaje. Posteriormente es posible separar, empleando electroforesis en gel de agarosa, los dos alelos gracias a la diferencia de tamaño de los fragmentos generados en el análisis de restricción. (*Stott et al., 1999*).
3. *Análisis de heterodúplex.* Se basa en la amplificación de un fragmento de DNA genómico, este fragmento se desnatura e inmediatamente se renaturaliza, para favorecer la unión de las dos hebras, con otro fragmento corto de ácido nucleico, llamado sonda, de secuencia conocida y complementaria a la secuencia diana, marcado de forma que

permita su detección (radiactivo, coloreado, fluorescente), formándose un heterodúplex. Cuando los fragmentos son renaturalizados y son corridos en un gel de acrilamida, las regiones no complementarias de los fragmentos de DNA formarán una horquilla que será el responsable de una migración más lenta del heterodúplex. Mutaciones y variaciones en la secuencia del DNA se detectan por la presencia de bandas que alteran la movilidad en el gel (*Su et al., 2003*).

4. *Hibridación específica de cebadores.* Una pequeña región del gen se amplifica se transfiere y se fija a una membrana de nylon, se hibrida con una sonda marcada, la cual es complementaria en secuencia al gen mutado o al haplotipo particular. La sonda puede estar marcada radiactivamente o no, y visualizarse por colorimetría o quimioluminiscencia (*Queck et al., 2007*). Los requerimientos necesarios de los métodos de diagnóstico y de screening incluyen entre otras características las de poseer una alta especificidad y reproducibilidad, bajo coste y la posibilidad de poder automatizarse. La tecnología empleada en el diagnóstico genético debe ser suficientemente robusta para permitir una clasificación exacta de todos los posibles genotipos del locus genético estudiado (*Eng et al., 2007*).

No obstante muchos de estos métodos requieren tiempo para su ejecución, una manipulación excesiva de la muestra con aumento del riesgo de contaminación y por lo tanto no gozan de la simplicidad y rapidez suficientes para ser usados de forma rutinaria en el diagnóstico molecular de enfermedades de origen genético.

Recientemente el análisis de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR se han podido detectar, cuantificar y en cierta medida automatizar gracias a una nueva metodología basada en la detección de la fluorescencia del DNA (Fluorescence Based DNA Análisis Technology, FDAT). Esta combinación de

tecnología PCR/FDAT ofrece el potencial suficiente para automatizar y caracterizar a bajo costo las mutaciones genéticas.

Esta tecnología permite realizar:

- Secuenciación automática de 600 bases con 98.5% de exactitud en un tiempo total de 2.5 horas.
- Medición de tamaños de diferentes fragmentos de DNA con una resolución de 2 bases en un tiempo de unos 20 minutos.
- Cuantificación de productos de RT-PCR de hasta 1000 pares de bases con una precisión mayor del 4%.
- Detección automática de fragmentos de DNA fluorescentemente marcados mediante electroforesis capilar.

El uso de la tecnología PCR/FDAT junto con la electroforesis capilar aumenta significativamente tanto la resolución como la sensibilidad de los ensayos, lo que permite trabajar con cantidades de DNA mucho menores, siendo además necesario usar un número menor de ciclos en la amplificación por PCR.

En el presente estudio se ha llevado a cabo la puesta a punto de un nuevo ensayo multiplex de extensión de una única base para la detección simultánea de las mutaciones más frecuentes de la región mediterránea, utilizando la detección fluorescente y electroforesis capilar. El ensayo de extensión de una única base, aquí descrito, permite de una forma específica y reproducible la discriminación alélica de las diferentes mutaciones diagnosticadas relacionadas con la trombofilia.

Nuestro ensayo se ha basado en el uso de la electroforesis capilar, que ha permitido la identificación de las mutaciones objeto de estudio de una forma rápida, eficaz y evitando la toxicidad de los productos usados en la electroforesis tradicional en geles (acrilamida, bromuro de etidio, etc.), además

de minimizar los costes ya que se requieren volúmenes más pequeños de muestra para realizar el diagnóstico.

Este ensayo se basa en el uso de ddNTPs marcados fluorescentemente junto con cebadores no marcados, los cuales se unen específicamente al DNA en la posición adyacente al nucleótido responsable de la mutación. En presencia de la polimerasa el cebador se extenderá en una única base, uniéndose el extremo 3' del cebador el ddNTP complementario dando un fragmento marcado fluorescentemente, que posteriormente se somete a electroforesis capilar detectándose la fluorescencia del ddNTP correspondiente.

El ensayo multicolor ofrece numerosas ventajas sobre los métodos tradicionales usados para la detección de las mutaciones responsables de la trombofilia, entre ellas se encuentra la rapidez, la simplicidad, una menor manipulación de las muestras evitando de esta forma posibles contaminaciones, junto con la posibilidad de semi-automatización y de análisis de un gran número de muestras que permite el uso de la electroforesis capilar.

La elevada especificidad de la incorporación de un solo ddNTP, catalizado por una DNA polimerasa, hace que la reacción de SNaPshot sea un método adecuado para la determinación de los polimorfismos de un solo nucleótido.

La posibilidad de utilizar un marcador interno de pesos moleculares permite la linearización de los picos y así poder detectar el fragmento de DNA objeto de estudio tanto por su tamaño como por su color, detectando de forma simultánea, en una única multiplex, todas las mutaciones.

La utilización del software de recogida de datos y de análisis de los mismos, Data Collection y GeneScan permite además la posibilidad de trabajar con 4 o 5 fluoróforos diferentes, y por lo tanto realizar el estudio simultáneo de las mutaciones objeto de estudio.

Esta tecnología nos ha permitido desarrollar un método nuevo semiautomático, de una alta reproducibilidad, ya que la movilidad

electroforética de los fragmentos analizados varía ± 1 nt del tamaño que presenta el fragmento, y también de una gran sensibilidad debido a la detección de la fluorescencia de los fluoróforos unidos a los fragmentos objeto de análisis.

De los datos obtenidos en diversos estudios se puede concluir que las prevalencias de los defectos trombofílicos en nuestro medio son: déficit de antitrombina 0,47% (0,23-0,86; IC 95%), déficit de proteína C 3,19% (2,48-4,02; IC 95%), déficit de proteína S 7,27% (6,21-8,45; IC 95%), anticuerpos antifosfolípidos 4,08% (3,28-5,01; IC 95%), resistencia a la proteína C activada 12,8% (7,9-12,7; IC 95%), mutación factor V Leyden 9,14 (5,4-14,2; IC 95%), mutación PTG20210A 17,2% (10,4-21,1; IC 95%) e hiperhomocisteinemia 23,4% (13,0-33,8; IC 95%). La probabilidad de encontrar anomalías es mayor en pacientes con menos de 45 años, en pacientes con episodios recurrentes, con antecedentes familiares, o que sus eventos tromboticos fueron espontáneos. La combinación de diversos factores clínicos se traduce en un incremento de la probabilidad de encontrar una deficiencia. (Mateo JM., 2002; Arranz., 2002; Mateo et al., 1998; Santamaría et al., 2001).

Sin embargo los conocimientos sobre la base molecular de esta patología son aún escasos. En un estudio multicéntrico realizado en nuestro país, el estudio EMET (Estudio Multicéntrico Español de Trombofilia) se observó que los factores genéticos de riesgo trombótico sólo se identificaban, en el mejor de los casos y dependiendo de la población estudiada, en el 60% de las familias con trombofilia. (Tirado I., 2004).

Gran parte de los defectos genéticos responsables de la trombofilia hereditaria en España están producidos por mutaciones puntuales que afectan a uno de los procesos moleculares relacionados con la expresión, transcripción o el procesamiento de los genes de la Protrombina, Factor V, MTHFR y Factor XII. Es por eso que el método desarrollado por nosotros en este trabajo, capaz de detectar las variaciones de un único nucleótido, es adecuado para la detección de las alteraciones genéticas causantes de la trombofilia.

El método que hemos desarrollado en este trabajo se ha aplicado para detectar las mutaciones G20210A, G1691A, C677T y C46T correspondientes a los genes de la Protrombina, Factor V, MTHFR y Factor XII en 1499 muestras de sangre de pacientes remitidos por el Servicio de Hematología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, entre octubre de 2007 y julio de 2010 con sospecha de trombofilia de acuerdo con lo expresado en Material y Métodos. De estos pacientes un 63.2% fueron mujeres y un 36.8% varones (Figura 44).

En relación con la frecuencia de presentación de las mutaciones del gen de la protrombina no se ha encontrado ningún individuo que presente una mutación en homocigosis y sólo un 5.54% de los 1499 individuos estudiados fueron heterocigotos para la mutación G20210A, el resto de los individuos no presentaron mutación alguna de este gen y representan el 94.46% del total de individuos estudiados. (Figura 35). En relación al sexo no se encontraron diferencias significativas respecto a la frecuencia de presentación de las mutaciones del gen de la protrombina entre varones y mujeres. (Figura 40).

En relación con la frecuencia de presentación de las mutaciones del gen del Factor V un 0.20% presentaron una mutación en homocigosis y un 9.21% fueron heterocigotos para la mutación G1691A no presentando mutación alguna para este gen la mayoría de los individuos estudiados alcanzando un porcentaje del 90.59% del total de los 1499 individuos estudiados. (Figura 36). Igual que en el caso anterior no se encontraron diferencias significativas respecto a la frecuencia de presentación de las mutaciones del gen del Factor V entre varones y mujeres. (Figura 41).

La frecuencia mayor de alteraciones genéticas de los individuos estudiados corresponde al gen de la Metileno-Tetrahidro-Folato-Reductasa (MTHFR), presentando la mayoría de ellos la mutación C677T en heterocigosis y representando un 46.36% del total de individuos estudiados. Un 20.71%

presentaron la mutación en homocigosis y un 32.93% no presentaron mutación alguna. (Figura 37). En relación con el sexo se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre varones y mujeres. Un porcentaje mayor de varones (25.2%) presentaron la mutación en homocigosis en relación con las mujeres (18.1%) y por el contrario la frecuencia de presentación de la mutación C677T en heterocigosis fue superior en mujeres (48.3%) respecto a la de los varones (43.0%). (Figura 42).

Finalmente el estudio de la mutación C46T correspondiente al Factor XII mostró que la mayoría de los individuos estudiados (66.43%) no presentaron la mutación, mientras que un 30.14% presentaron la mutación en heterocigosis y un 3.44% en homocigosis. (Figura 38). En relación al sexo no se encontraron diferencias significativas respecto a la frecuencia de presentación de las mutaciones del gen del Factor XII entre varones y mujeres. (Figura 43).

De los individuos que presentaron la mutación C46T en homocigosis el 85% de ellos presentaron valores plasmáticos de Factor XII inferior a 65. El Factor XII es una serinproteasa del sistema de contacto que juega un papel en los sistemas de coagulación y fibrinólisis. Desde que se describió que el FXII activado (FXIIa) actuaba como activador del plasminógeno (Braat et al., 1999) se ha observado que la disminución de niveles plasmáticos de FXII podría desencadenar una trombosis como resultado de un sistema fibrinolítico deficiente. No obstante la función biológica del FXII es aún controvertida faltando por conocer muchas de las reacciones en las que interviene. Hoy día se conoce que los individuos homocigotos tienen un riesgo de enfermedad tromboembólica 5 veces mayor que los no portadores. (Reuner et al., 2008). Existen estudios donde se observa que niveles plasmáticos bajos de FXII mostraban una tendencia a incrementar el riesgo de trombosis. (Tirado et al., 2004). No obstante se requieren más estudios para poder definir claramente la implicación en el riesgo de trombosis del polimorfismo C46T.

El resultado de la asociación de las mutaciones de los cuatro genes llevadas a cabo en este estudio (Figura 39) muestra que el grupo mayoritario (28.1%) corresponde a individuos que presentan la mutación C677T en heterocigosis en el gen de la MTHFR y no presentan mutaciones en el resto de los genes. Un 12.2% de individuos presentan la mutación C677T en homocigosis en el gen de la MTHFR no presentando mutación en el resto de los genes. El 10.8% de los individuos presentaron la mutación C677T en heterocigosis de la MTHFR asociada a la mutación C46T en el gen del FXII en heterocigosis. El 9.4% de los individuos presentaron la mutación C46T en heterocigosis del FXII no asociándose a ninguna otra mutación del resto de los genes estudiados. El 6.2% presentaron la mutación C46T del FXII en heterocigosis asociada a la mutación C677T de la MTHFR en homocigosis. Los individuos que no presentaron mutaciones en ninguno de los genes estudiados representan un 17.4% del total. El resto de las posibles asociaciones que se muestran en la tabla 10 alcanzaron porcentajes inferiores a un 2%.

Cuando se estudia la relación existente entre las mutaciones de cada uno de los genes estudiados de forma individual con los 21 parámetros de laboratorio se observa en nuestro trabajo que sólo existe una relación significativa entre las alteraciones del gen del Factor V, MTHFR y Factor XII con la Resistencia a la Proteína C activada (RPCa), la Proteína S funcional, el Dímero D, el VV Russel diluido Screen, β -2 Glucoproteína IgG, Homocisteína, APTT y TTPA-SP.

En los individuos con mutación del gen del Factor V tanto en homocigosis como en heterocigosis existe una disminución significativa de la Resistencia a la Proteína C activada y de la Proteína S funcional con una significación inferior a $p < 0.05$. Aunque el valor del VV Russel diluido Screen y de la β -2 Glucoproteína IgG se encuentran disminuidos y el valor del Dímero D aumentado cuando el gen del Factor V se encuentra mutado, sin embargo esta

relación solamente es significativa si la mutación es en heterocigosis y el nivel de significación es menor al encontrado en relación con la Resistencia a la Proteína C y la Proteína S funcional. El hecho de no encontrarse una relación tan significativa de estos parámetros con la alteración del gen del Factor V en homocigosis puede ser debido al menor tamaño muestral de individuos con esta alteración.

Respecto a los individuos que presentan una mutación del gen de la MTHFR , esta sólo se relaciona, de entre todos los parámetros de laboratorio estudiados, con la Homocisteína que presenta valores superiores a la normalidad tanto cuando el gen está mutado en heterocigosis como en homocigosis con niveles de significación de $p < 0.000$. Los individuos homocigotos para esta mutación presentan un valor de homocisteína en plasma hasta un 47% superior al de los individuos no afectados por esta mutación. En el caso de los individuos heterocigotos la elevación de la homocisteína plasmática es un 11% superior.

En nuestro estudio el polimorfismo C46T del gen del Factor XII, tanto en homocigosis como en heterocigosis, sólo se asocia entre los 21 parámetros de laboratorio estudiados con niveles superiores de APTT y TTPA-SP siendo estos mayores en los pacientes homocigotos con niveles de significación de $p < 0.000$.

Los resultados obtenidos de la comparación de los individuos que presentaban mutaciones en más de un gen con los 21 parámetros de laboratorio son concordantes con aquellos que presentaban mutaciones en un solo gen. Así, los valores de la Proteína S funcional y la Resistencia a la Proteína C activada estaban disminuidos en aquellos individuos en los que concurrían una mutación en el gen del Factor V tanto en heterocigosis como en homocigosis con una significación de $p < 0.000$ y el valor de la Homocisteína se encontraba elevado igualmente con una significación de $p < 0.000$ en aquellos individuos en los que

concurrían una mutación en el gen de la MTHFR tanto en heterocigosis como en homocigosis. Tanto para la Proteína S funcional y la Resistencia a la Proteína C activada como para la Homocisteína las mayores diferencias se producían cuando el gen del Factor V y el de la MTHFR se encontraban mutados en homocigosis.

Respecto a la comparación de los valores del Dímero D y de la β -2 Glucoproteína IgG de los individuos que presentaban mutaciones en más de un gen aunque presentan diferencias significativas entre grupos sin embargo, no alcanzan el nivel de significación de $p < 0.000$ que hemos estimado que debe ser el valor a tener en cuenta para que puedan ser biológicamente significativos debido al escaso número de individuos en algunos de los grupos.

Debido a que los grupos 11, 12 y 13 sólo cuentan con un individuo se dejan fuera en la comparación realizada entre los grupos restantes (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 14 con 365, 164, 371, 19, 19, 16, 37, 17, 4, 7 y 5 pacientes respectivamente) . (Tabla 10).

Nuestros resultados son consistentes y comparables con los obtenidos por otros autores. Los primeros pacientes con deficiencia de Proteína C y déficit de Proteína S y trombosis fueron descritos al principio de los 80 (*Griffin et al.*, 1981; *Comp et al.*, 1984). Ya en los 90 se describieron tres familias con trombosis venosa asociada con la resistencia a la proteína C activada (*Dahlback et al.*, 1993) y en 1994 el defecto genético asociado fue descrito de forma simultánea por tres laboratorios afectando a una mutación del gen del factor V, sustituyendo una Arg506 por una Gln y denominándose *factor V de Leiden* (*Bertina et al.*, 1994; *Greengard et al.*, 1994; *Voorberg et al.*, 1994). La alta prevalencia de esta mutación en la población general, entre un 2-5% (*Reis et al.*, 1995; *Zivelin et al.*, 1997), la convierte en una buena candidata como posible factor de riesgo trombótico adicional en las familias portadoras de deficiencias

de PC o de PS, y los estudios posteriores así lo demuestran, ya que los pacientes portadores del FVL en combinación con alguna de estas deficiencias muestran un riesgo más elevado de sufrir accidentes trombóticos que los portadores de una sola de las deficiencias (*Koeleman et al., 1994; Zöller et al., 1995*).

La resistencia a la Proteína C activada (PCA) puede estar causada por defectos moleculares heterogéneos aunque el reemplazo de una Arg506 por Gln en el factor V, mutación conocida como factor V de Leiden (FVL) es la responsable de la resistencia a la PCA al menos en el 90% de los casos. La resistencia a la PCA es la alteración fenotípica de laboratorio, mientras que el factor V GLN506 es el genotipo y el término resistencia a la PCA no debería emplearse como sinónimo de *factor V de Leiden*. La resistencia a la PCA producida por defectos diferentes al factor V de Leiden se asocia con riesgo de trombosis venosas (*De Visser et al., 1999*) o accidentes isquémicos cerebrovasculares (*Van der Bom et al., 1996*). El riesgo de trombosis venosa en heterocigotos de FVL es siete veces mayor aumentando hasta 80 veces en homocigotos, sin embargo muchos de ellos nunca desarrollaran la trombosis excepto cuando se combina la mutación con otros factores de riesgo; por tanto las manifestaciones clínicas de trombofilia en pacientes con FVL dependen de otros factores: La presencia de FVL junto con deficiencia de proteína C, proteína S y antitrombina hace que el riesgo trombótico sea superior al asociado a cada una de ellas por separado. (*Ridker et al., 1997*). En individuos con doble heterocigosis para FVL y protrombina G20210>A el riesgo trombótico es veinte veces mayor. En nuestro estudio hemos detectado diez pacientes heterocigotos para protrombina y Factor V, que además coinciden con un descenso significativo de los valores plasmáticos de la Resistencia a la Proteína C. En individuos en los que la heterocigosis es solo para FVL o protrombina el riesgo de desarrollar trombosis sólo es cinco veces superior al que presenta la población en general. (*Emmerich et al., 2001*). En familias con defectos

combinados las trombosis son más frecuentes y aparecen en edades más tempranas.

El segundo defecto más común tras el Factor V de Leiden en la trombofilia hereditaria es la mutación G20210A del gen de la protrombina. En nuestro estudio no hemos detectado ningún individuo portador de la mutación G20210A en homocigosis, detectando un 5.54% de heterocigotos para esta mutación.

Las manifestaciones clínicas de esta mutación son variables, muchos individuos que son homocigotos o heterocigotos para la mutación G20210A nunca desarrollarán trombosis. Otros heterocigotos no tendrán complicaciones hasta bien entrada la edad adulta mientras que por el contrario algunos pacientes tendrán trombosis recurrentes antes de los treinta años. El riesgo de trombofilia por mutación de la protrombina se ve incrementado por la coexistencia con otras anomalías genéticas como el FVL o con deficiencia de la Proteína S.

La hiperhomocisteinemia genética es un trastorno autosómico recesivo que se caracteriza por un defecto grave de la cistationina β -sintetasa, 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) o de otras enzimas que intervienen en el metabolismo de la homocisteína y se asocia con un riesgo incrementado de trombosis venosa. (*Den Heijer et al., 1998*).

La causa más común de hiperhomocisteinemia grave es una cistationina β -sintetasa defectuosa. Se ha demostrado que los niveles elevados de homocisteína pueden deberse a causas adquiridas como niveles por debajo de lo normal de folato y vitaminas B₆ y B₁₂ o fallo renal en cuyo caso la administración de folato con vitaminas B₆ y B₁₂ puede reducir los niveles de homocisteína. (*Den Heijer et al., 1998*) pero también se han identificado factores genéticos causantes de la hiperhomocisteinemia. La causa genética mejor conocida de hiperhomocisteinemia afecta al gen MTHFR con un

polimorfismo C677T que produce un reemplazo de Ala222 por Val dando lugar a una variante de la enzima que tiene menor actividad y que ve incrementada su sensibilidad a la inactivación por calor (termolabilidad). En homocigosis esta mutación provoca una variante termolábil de la enzima MTHFR que presenta una actividad residual del 50 % en su función de transferencia de grupos metilo en la vía de la remetilación de la homocisteína. Puesto que esta enzima usa como cofactor ácido fólico, la actividad enzimática se ve drásticamente reducida en situaciones carenciales de folatos. La forma homocigótica TT 677 se asocia con una hiperhomocisteinemia moderada y es considerada como un factor de riesgo de la ETV, lo que concuerda con los resultados de nuestro estudio.

La hiperhomocisteinemia se asocia con frecuencia a ETV, además de, enfermedad arterial. En diferentes metaanálisis se ha demostrado que el riesgo de presentar trombosis venosa si las concentraciones de homocisteína son altas es de 2.5 a 3. (*Den Heijer et al., 1998*). Sin embargo, existe controversia ya que otros autores afirman que en las formas homocigóticas de este defecto enzimático en ausencia de otros factores de riesgo trombótico no se produce un incremento del riesgo de tromboembolismo. (*Salomon et al., 1999; Bezemer et al., 2007*). Los pacientes que son homocigóticos para el gen de la MTHFR y que tienen también el factor V de Leiden o mutación en el gen de la protrombina presentan un incremento del riesgo de trombosis. (*Salomon et al., 1999*). Situación que ocurre en 27 de los individuos estudiados por nosotros en este trabajo. En heterocigotos la presencia de esta mutación no aumenta el riesgo de TVP, ni tan siquiera en los pacientes con factor V Leiden o mutación del gen de la protrombina. (*Brown et al., 1998*), situación que ocurre en 59 de los individuos estudiados por nosotros en este trabajo.

Los resultados de nuestro estudio que demuestra que una alteración del gen de la MTHFR sólo se asocia con una elevación de los niveles plasmáticos de homocisteína están de acuerdo y corroboran lo expuesto anteriormente.

Hace algunos años (Cooper et al., 2002) se propuso que características deben de cumplir los estudios de trombofilia para ser considerados válidos en el análisis de factores genéticos de riesgo a padecer enfermedades complejas tales como tamaño grande de muestra, valores de significación estadística pequeños y que el producto del gen portador genético analizado deba tener alguna implicación fisiológica o biológica en la enfermedad.

En los resultados mostrados en este trabajo en el que se analizan las mutaciones G20210A, G1691A, C677T y C46T correspondientes a los genes de la Protrombina, Factor V, MTHFR y Factor XII así como 21 parámetros diferentes de laboratorio cumplimos con dichos requisitos pues contamos con una amplia muestra de 1499 individuos y tomamos como criterio de significación estadística valores de p menores de 0.05 y en algunos casos de 0.000 Igualmente hemos demostrado en este trabajo que el nuevo método que hemos desarrollado para el diagnóstico molecular de esta enfermedad es fiable, reproducible, fácil de llevar a cabo y con bajo costo. Por todo lo cual los resultados obtenidos en este trabajo satisfacen las recomendaciones para este tipo de estudios.

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que para el diagnóstico de la trombofilia hereditaria al menos se debe de incluir la detección de las mutaciones G20210A, G1691A, C677T y C46T correspondientes a los genes de la Protrombina, Factor V, MTHFR y Factor XII (cuando los niveles plasmáticos de FXII sean inferiores a 65) así como la determinación de los valores plasmáticos de la Resistencia a la Proteína C, Proteína S y Homocisteína.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

1. La elevada especificidad de la incorporación de un solo ddNTP, catalizado por una DNA polimerasa, junto con la electroforesis capilar y la detección fluorescente hace que la reacción SNaPshot sea un método muy adecuado para la detección de los cambios de un solo nucleótido responsables de las mutaciones G20210A, G1691A, C677T y C46T en los genes de la Protrombina, El Factor V, la Metilentetrahidrofoloreductasa y el Factor XII respectivamente.
2. Las condiciones idóneas para la detección de las mutaciones responsables de la trombofilia objeto de este trabajo han sido las siguientes:
 - a) Reacción de obtención del amplicón:

Una concentración de DNA de 50 ng, una concentración de cebadores de 0.2 μ M, una concentración de dNTPs de 200 μ M, 1.5 μ M de Cl_2Mg ; 1 U Taq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems); 1X Buffer PCR II (que contiene 10 mM tris HCl a un pH de 8.3 u 50 mM de KCl). Todo en ello para un volumen final de 25 μ L.

El programa de desnaturalización fue el siguiente: desnaturalización inicial de 10 min a 95°C, 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos, con una temperatura de 55°C durante 30 s y de 72° C durante 2 minutos; y una extensión final a 72°C durante 7 min.

- b) Reacción de extensión de un solo nucleótido:

La reacción de SNaPshot contenía en un volumen final de 10 µL: 5 µL de “SNaPshot multiplex Ready Reaction Mix”, 3 µL de producto de amplificación y una concentración final de 0,2 mM de cebadores.

El programa de amplificación fue el siguiente: 10 min a 95°C seguido de 30 ciclos a una temperatura de 95° durante 15 s y a una temperatura de 59°C durante 1 minuto.

3. Con la aplicación de este método se han estudiado 1499 pacientes habiéndose encontrado los siguientes genotipos: G20210A para el gen de la protrombina heterocigoto (PT HT) y normal, G1691A para el gen del Factor V heterocigoto (FV HT), homocigoto (FV HOM) y normal, C677T para el gen de la MTHFR heterocigoto (MTHFR HT), homocigoto (MTHFR HOM) y normal y C46T para el gen del Factor XII heterocigoto (FXII HT), homocigoto (FXII HOM) y normal.

4. La frecuencia alélica de las mutaciones detectadas ha sido la siguiente: 5.54% de PT HT, 0.20% de FV HOM, 9.21% de FV HT, 20.71 de MTHFR HOM, 46.36% de MTHFR HT, 3.44% de FXII HOM y 30.14% de FXII HT.

5. En los pacientes con mutación en el gen de la MTHFR se han encontrado diferencias significativas en relación al sexo ($p < 0.05$). En concreto hay un mayor porcentaje de homocigotos en varones y por el contrario en el caso de heterocigosis el porcentaje es superior en mujeres.

6. Se han encontrado diferencias significativas en los siguientes parámetros de laboratorio respecto a los siguientes genotipos: FV y Resistencia a la Proteína C (NPM vs HT, HOM vs HT, NPM vs HOM), FV y Proteína S (NPM vs HT, NPM vs HOM), Dímero D y FV (NPM vs HT), VV Russel y

FV (NPM vs HT), Ac β -2 Glucoproteína 1 y FV (NPM vs HOM), Homocisteína y MTHFR (HOM vs HT, NPM vs HT), APTT y FXII (HOM vs HT, NPM vs HT, NPM vs HOM) y por último TTPA-SP y Factor XII (HOM vs HT, NPM vs HT, NPM vs HOM).

7. Conclusión final: Para el diagnóstico de la trombofilia hereditaria al menos se debe de incluir la detección de las mutaciones G20210A, G1691A, C677T y C46T correspondientes a los genes de la Protrombina, Factor V, MTHFR y Factor XII (cuando los niveles plasmáticos de FXII sean inferiores a 65) así como la determinación de los valores plasmáticos de la Resistencia a la Proteína C, Proteína S y Homocisteína.

VII. BIBLIOGRAFÍA

A

- **Abramson N, Costantino JP, Garber JE, Berliner N, Wickerham DL, Wolmark N:** Effect of Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations on thromboembolic risk in the national surgical adjuvant breast and bowel project breast cancer prevention trial. *J Natl Cancer Inst* 98: 904-10. 2006.
- **Aiach M, Borgel D, Gaussen P, Emmerich J, Alhenc Gelas M, Gandrille S:** Protein C and protein S deficiencies. *Semin Hematol* 34: 205-216. 1997.
- **Allaart CF, Aronson Dc, Ruys T, Rosendaal FR, van Bockel JH, Bertina RM, Briet E:** Hereditary protein S deficiency in young adults with arterial occlusive disease. *Thromb Haemost* 64: 206-210. 1990.
- **Amer L, Kisiel W, Searles RP, Williams RC Jr:** Impairment of the protein C anticoagulant pathway in a patient with systemic lupus erythematosus, anticardiolipina antibodies and thrombosis. *Thromb Res* 57; 247- 1990.
- **Arranz JM:** Prevalencia de las alteraciones biológicas causantes de trombofilia en la población española. *Tesis Doctoral*. Universidad de Barcelona 2002.

B

- **Balogh I, Szôke G, Kárpáti L, Wartiovaara U, Katona E, Komáromi I, et al:** Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood* 96: 2479-86. 2000.
- **Barret-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, McNabb MA, Wenger NK:** Effects of raloxifeno on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 355: 125-37. 2006.
- **Bates SM:** Consultative hematology: the pregnant patient pregnancy loss. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program:* 166-172. 2010.
- **Benedetto C, Marozio L, Tavella AM, Salton L, Grivon S, Di Giampaolo F:** Coagulation disorders in pregnancy: acquired and inherited thrombophilias. *Ann NY Acad Sci* 1205: 106-17. 2010.
- **Bereczky Z, Katona E, Muszbek L:** Fibrin stabilization (factor XIII), fibrin structure and thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 33: 430-7. 2003/2004.
- **Berger M, Mattheisen M, Kulle B, Schmidt H, Oldenburg J, Bickeboller H, et al:** High factor VIII levels in venous thromboembolism show linkage to imprinted loci on chromosomes 5 and 11. *Blood* 105:638-44.2005.
- **Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E, Lunghi B, Castaman G, Sacchi E, Mannucci PM:** A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood* 90:1552-7. 1997.

- **Bertina RM, Koeleman BP, Koster T et al:** Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369: 64, 1994.
- **Beutler E, Lichtman, MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligson U:** Williams Hematology, Cap. 24 (Mosesson MW). 6 ed. en español. Marban libros. 2005.
- **Beutler E, Lichtman, MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligson U:** Williams Hematology, Cap. 127. (Goodnight SH; Griffin JH). 6 ed. en español. Marban libros. 2005.
- **Beutler E, Lichtman, MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligson U:** Williams Hematology, Cap. 122.(Seligsohn U; White GC). 6 ed. en español. Marban libros. 2005.
- **Bezemer ID, Doggen CJ, Vos HL, Rosendaal FR:** No association between the common MTHFR 677C→T polymorphism and venous thrombosis: results from the MEGA study. *Arch Intern Med* 167: 497-501. 2007.
- **Bezemer ID, van der Meer FJ, Eikenboom JC, Rosendaal FR, Doggen CJ:** The value of family history as a risk indicator for venous thrombosis. *Arch Intern Med* 169:610-5. 2009.
- **Blanco Molina A, Monreal M:** Venous thromboembolism in women taking hormonal contraceptives. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 8(2):211-15. 2010.
- **Bloemenkamp KWM, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Buller HR, Vanderbroucke JP:** Enhancement by factor V de Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing third-generation progestagen. *Lancet* 346: 1593. 1995.
- **Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR:** Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA* 293:715-22. 2005.

- **Bolan CD, Krishnamurti C, Tang DB, Carrington LR, Alving BM:** Association of protein S deficiency with thrombosis in a kindred with increased levels of plasminogen activator inhibitor-1. *Ann Intern Med* 119: 779, 1993.
- **Braat EA, Dooijewaard G, Rijken DC:** Fibrinolytic of activated FXII. *Eur J Biochem* 263:904-911. 1999
- **Brenner B, Aharon A:** Thrombophilia and adverse pregnancy outcome. *Clin Perinatol* 34(4): 527-541. 2007.
- **Brown K, Luddington R, Baglin T:** Effect of the MTHFR C677T variant on the risk of venous thromboembolism: interaction with factor V Leiden and prothrombin (G20210A) mutations. *Br J Haematol* 103: 42-44. 1998.

C

- **Cai H, Hua B, Fan L, Wang Q, Zhao Y:** A novel mutation (g2172c) in the factor V gene in a Chinese family with hereditary activated protein C resistance. *Thromb Res* 125(6): 545-8. 2010.
- **Cesarman-Maus G, Hajjar KA:** Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 129:307-321. 2005.
- **Chan WP, Lee CK, Kwong YL, Lam CK, Liang R:** A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood* 91: 1135-9. 1998.
- **Cochery-Nouvellon E, Mercier E, Lissalde-Lavigne G, Daurès JP, Quéré I, Dautat M, et al:** Homozygosity for the C46T polymorphism of the F12 gene is a risk factor for venous thrombosis during the first pregnancy. *J Thromb Haemost* 5:700-7. 2007.

- **Coller BS, Owen J, Jesty J, Horowitz D, Reitman MJ, Spear J, Yeh T, Comp PC.** Deficiency of plasma protein S, protein C, or antithrombin III and arterial thrombosis. *Arteriosclerosis* 456-462. 1987.
- **Cooper DN, Nussbaum RL, Krawezak M:** Proposed guidelines for papers describing DNA polymorphism-disease associations. *Hum Genet* 110: 207-208. 2002.
- **Corral J, González-Conejero R, Rivera J, Ortuno F, Aparicio P, Vicente V:** The 807 C/T polymorphism of the alpha2 gene in platelet GP Ia collagen receptor expression and function —effect in thromboembolic diseases. *Thromb Haemos* 81:951-6. 1999.
- **Corral J, González-Conejero R, Soria JM, González-Porras JR, Pérez-Ceballos E, Lecumberri R, et al:** A nonsense polymorphism in the protein Z-dependent protease inhibitor increases the risk for venous thrombosis. *Blood* 108: 177-83. 2006.
- **Corral J, Hernández-Espinosa D, Soria JM, González-Conejero R, Ordóñez A, González-Porras JR, et al:** Antithrombin Cambridge II (Ala384Ser): an underestimated but strong and frequent genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood* 109 (10): 4258-63. 2007.
- **Corral J, Iniesta JA, González-Conejero R, Villalón M, Vicente V:** Polymorphisms of clotting factors modify the risk for primary intracranial hemorrhage. *Blood.* 97:2979-82. 2001.
- **Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, et al:** The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1:95-101. 2007.

D

- **D'Angelo A, Selhub J:** Homocysteine and thrombotic disease. *Blood* 90: 1. 1997.
- **Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ:** Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterised by a poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1004-1008.1993.
- **Dahlbäck B:** Blood coagulation. *Lancet* 255: 1627-1632.2000.
- **Dahlbäck B:** Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis, is due to a mutation in the factor V gene. *Haemostasis* 24: 139. 1994.
- **Dahlbäck B:** The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis. *Thromb Res* 1995; 77:1-43.
- **Dahlbäck B, Stenflo J.:**Regulatory mechanisms in hemostasis: natural anticoagulants. En: *Hematology. Basic principles and practice*. 5th Edition. (Hoffman R et al (eds). Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, pp1843-1849. USA 2009.
- **Davie EW, Ratnoff OD.:** Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145:1310-1312. 1964.
- **De Haro Muñoz T:** Desarrollo de un método para la detección simultánea de las mutaciones más frecuentes de la β -Talasemia en España. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada. 2008.
- **De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Rossi E, Chiusolo P, Casorelli I, Leone G:** The risk of recurrent venous thromboembolism among heterozygous carriers of the G20210A prothrombin gene mutation. *Br J Haematol* 113:630–5. 2001.

- **De Visser MCH, Rosendaal FR, Bertina RM:** A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V de Leiden increases the risk of venous thrombosis. *Blood* 93: 1271, 1999.
- **De Vries JIP, Dekker GA, Huijgen et al:** Hyperhomocysteinaemia and protein S deficiency in complicated pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 104: 1248. 1997.
- **Den Heijer M, Brouwer IA, Bos GMJ et al:** Vitamin supplementation reduced blood homocysteine levels-a controlled trial in patients with venous thrombosis and healthy volunteers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 356. 1998.
- **Den Heijer M, Koster T, Blom HJ:** Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 334: 759,. 1996.
- **Den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WBJ, Bos GMJ:** Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 80: 874, .1998.
- **Duggan C, Marriott K, Edwards R, Cuzick J:** Inherited and acquired risk factors for venous thromboembolic disease among women taking tamoxifeno to prevent breast cancer. *J Clin Oncol* 21: 3588-93. 2003.

E

- **Ebert R:** Index of variant humans fibrinogens, pp 1-426. *CRC Press Boca Raton. FL.* 1994.
- **Edenbrandt C-M, Lundwall A, Wydro r, Stenflo J:** Molecular analysis of the gene for vitamin K-dependent protein S and its pseudogene. Cloning and partial characterization. *Biochemistry* 29:7861. 1990.

- **Eichinger S, Stümpflen A, Hirschl M et al:** Hyperhomocysteinemia is a risk factor of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 80: 566, .1998.
- **Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, Arruda V, Hillarp A, Reny JL:** Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group For Pooled Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost* 86: 809-816.2001.
- **Eng B, Walker L, Nakamura LM, Hoppe C, Azzimi M, Lee H, Wayne JS.** Three new beta-globin gene promoter mutations identified through newborn screening. *Hemoglobin* 2007; 31: 129-134.
- **Esmon CT :**The protein C pathway. *Chest* 124(3 Suppl):26S- 32S. 2003.

F

- **Fay W, Garg N, Sunkar M:** Vascular functions of the plasminógeno activation system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1231-1237. 2007.
- **Franco RF, Fagundes MG, Meijers JCM, Reitsma PH, Lourenço D, Morelli V:** et al. Identification of polymorphisms in the 5'-untranslated region of the TAFI gene: relationship with plasma TAFI levels and risk of venous thrombosis. *Haematologica* 86:510-7. 2001.
- **Franco RF, Reitsma PH:** Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet* 109:369-84. 2001.
- **Furie B, Furie BC:** Mechanims of thrombus formation. *N Engl J Med* 359:938-949. 2008.

- **Furie B, Furie BC:** Molecular basis of blood coagulation. Hematology basic principles and practice. 5th edition. Hoffman R et al (eds). Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, pp1819-1836. USA 2009.
- **Furie B, Furie BC:** Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest* 115:3355-62. 2005.

G

- **Gerhardt A, Scharf RE, Beckmann MW, Struve S, Bender HG, Pillny M, Sandmann W, Zotz RB:** Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N Engl J Med* 342:374–80. 2000.
- **Gomez K, McVey JH:** Tissue factor initiated blood coagulation. *Front Biosci.* 11:1349-59. 2006.
- **González Porras J.R, Barbosa Barros M, López M.L, Alberca I, Lozano Sánchez F. S:** Nueva etiología de la trombosis venosa profunda: mutación G1277A del gen del inhibidor dependiente de la proteína Z. *Angiología* 60, 4: 273-77. 2008.
- **Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D et al:** Prothrombotic genetic risk factors and the occurrence of gestational hypertension with or without proteinuria. *Thromb Haemost* 81: 349-. 1999.
- **Greer IA:** Thrombosis in pregnancy: maternal and fetal issues. *Lancet* 353: 1258-. 1999.
- **Guttomsen AB, Veland PM, Nesthus I, Nygard O, Schneede J, Vollset SE, Refsum H.:** Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (> or = 40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study. *J Clin Invest* 98: 2174-83. 1996

H

- **Harris EN, Hughes GR, Gharavi AE:** The antiphospholipid antibody syndrome. *J Rheumatol* 13 (suppl): 210. 1987.
- **Haverkate F, Samama M:** Familial dysfibrinogenemia and thrombophilia. Report on a study of the SSC Subcommittee on Fibrinogen. *Thromb Haemost* 73: 151. 1995.
- **Heit JA, Sobell JL, Li H, Sommer SS:** The incidence of venous thromboembolism among Factor V Leiden carriers: a community-based cohort study. *J Thromb Haemost* 3: 305-11. 2005.
- **Herrington DM, Vittinghoff E, Howard TD, Major DA, Owen J, Reboussin DM, Bowden D, Bittner V, Simon JA, Grady D, Hulley SB:** Factor V Leiden, hormone replacement therapy, and risk of venous thromboembolic events in women with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1012-7. 2002.
- **Hoffman M, Monroe DM:** Rethinking the coagulation cascade. *Curr Haematol Rep* 4:391-396. 2005.
- **Hoffman M, Monroe DM:** A cell-based model of hemostasis. *Thromb haemost* 85:98-965. 2001.
- **Holzman NA, Marteau TM:** Will genetics revolutionize Medicine. *N Engl J Med* 343: 141-4. 2000.
- **Hughes GR:** The anticardiolipin syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 3: 285. 1985.
- **Humphries SE, Cook M, Dubowitz M, Stirling Y, Meade TW:** Role of genetic variation at the fibrinogen locus in determination of plasma fibrinogen concentrations. *Lancet* 1:1452-5. 1987.

I

- Investigation and management of heritable thrombophilia. Guideline. *British Journal of Haematology* 114. 512-528. 2001.

J

- **James AH:** Venous thromboembolism in pregnancy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(3): 326-31. 2009.
- **Jordan K, Kristensen K:** Purpura fulminans. *Ugeskr Laeger* 172: 2064-5, 2010.
- **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* 140:330-7. 2004.

K

- **Kearon C, Salzman EW, Hirsh J:** Epidemiology, pathogenesis, and natural history of venous thrombosis: In Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, editors. *Hemostasis and thrombosis*. 4th ed. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins. P1153-77. 2001.

- **Kosar A, Kasapoglu B, Kalyoncu S, Balcik OS, Gümüs EI, Turan H:** Treatment of adverse perinatal outcome in inherited thrombophilias: a clinical study. *Blood Coagul Fibrinolysis* 22(1) 14-8. 2011.
- **Koster T, Blann AD, Briet E, Vanderbroucke JP, Rosendaal FR:** Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor of occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* 345:152-55. 1995.
- **Krnic Barrie S, O'Connor CR, Looney SW, Pierangeli SS, Harris EN:** A retrospective review of 61 patients with antiphospholipid syndrome. Analysis of factors influencing recurrent thrombosis. *Arch Intern Med* 96: 3. 1997.
- **Kuipers S, Cannegieter SC, Doggen CJ, Rosendaal FR:** Effect of elevated levels of coagulation factors on the risk of venous thrombosis of long-distance travelers. *Blood* 11: 2064-9. 2009.
- **Kujovich J:** Factor V Leiden Thrombophilia. In: Pagon RA, Bird, TC, Dolan CR, Stephens K. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. 1999 . Updated 2010.
- **Kujovich, J:** Factor V Leiden Thrombophilia. *Genet Med* Jan;13(1):1-16.2011
- **Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, et al:** Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 340: 9-16. 1999.
- **Kyrle PA, Minar E, Hirschl M et al:** High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 343:457-462. 2000.

L

- **Laczkovics C, Grafenhofer H, Kaider A, Quehenberger P, Simanek R, Mannhalter C, Lechner K, Pabinger I:** Risk of recurrence after a first venous thromboembolic event in young women. *Haematologica* 92: 1201-7. 2007.
- **Le Cam-Duchez V, Chretien MH, Saugier-veber P, Borg JY:** Factor V Cambridge mutation and activated protein C resistance assays. *Thromb Haemost* 95: 581-3. 2006.
- **League S, Hooper WC:** Molecular diagnosis of inherited thrombosis. *Clin Lab Scien* 18 , 4: 271-78. 2005.
- **Legnani C, Palareti G, Guazzaloca G, Cosmi B, Lunghi B, Bernardi F, Coccheri S:** Venous thromboembolism in young women; role of thrombophilic mutations and oral contraceptive use. *Eur Heart J* 23:984-90. 2002.
- **Lensen R, Bertina RM, Vanderbroucke JP, Rosendaal FR:** High factor VIII levels contribute to the thrombotic risk in families with factor V Leiden. *Br J Haematol* 114:380-6. 2001.
- **López Andres N:** Estudio de laboratorio de los estados de hipercoagulabilidad. SEQC. *Ed Cont Lab Clin* 6:22-29. 2003.
- **López-Sagaseta J, Montes R, Puy C, Díez N, Fukudome K, Hermida J.** Binding of factor VIIa to the endothelial cell protein C receptor reduces its coagulant activity. *J Thromb Haemost* 5:1817-24. 2007.
- **Lunghi B, Iacoviello L, Gemmati D, Dilasio MG, Castoldi E, Pinotti M, Castaman G, Redaelli R, Mariani G, Marchetti G, Bernardi F:** Detection of new polymorphic markers in the factor V gene: association with factor V levels in plasma. *Thromb Haemost* 75:48-8. 1996.

M

- **Macfarlane RG:** An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature* 202:498-499. 1964.
- **Mackman N, Tilley R, Key NS:** Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1687-93. 2007.
- **Mahasandana C, Suvattte V, Marlar RA, Amnco Johson MJ, Jacobson LJ, Hathaway WE.** Neonatal purpura fulminans associated with homozygous protein S deficiency. *Lancet* 355: 61-62. 1990.
- **Makris M, Preston FE, Beauchamp NJ, Cooper PC, Daly ME, Hampton KK, Bayliss P, Peake IR, Miller GJ.** Co-inheritance of the 20210A allele of the prothrombin gene increases the risk of thrombosis in subjects with familial thrombophilia. *Thromb Haemost* 78:1426-9. 1997.
- **Mann KG, Brummel K, Butenas S:** What is all thrombin for ?. *J Thromb Haemostas* 1:1504-1514. 2003.
- **Many A, Elad R, Yaron Y, Eldor A, Lessing JB, Kupferminc MJ:** Third-trimester unexplained intrauterine fetal death is associated with inherited thrombophilia. *Obstet Gynecol* 99:684-7. 2002.
- **Marciniak E, Romond EH,:** Impaired catalytic function of activated protein C: a new in vitro manifestation of lupus anticoagulant. *Blood* 74: 2426-32. 1989.
- **Martinelli I, Battaglioli T, Bucciarelli P, Passamonti SM, Mannucci PM:** Risk factors and recurrence rate of primary deep vein thrombosis of the upper extremities. *Circulation* 110:566-70. 2004.

- **Martinelli I, Cattaneo M, Taioli E, De Stefano V, Chiusolo P, Mannucci PM:** Genetic risk factors for superficial vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1;82:1215–7. 1999.
- **Martinelli I, De Stefano V, Taioli E, Paciaroni K, Rossi E, Mannucci PM:** Inherited thrombophilia and first venous thromboembolism during pregnancy and puerperium. *Thromb Haemost* 87:791–5.2002.
- **Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Mannucci PM:** High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med* 338:1793–7. 1998.
- **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* 19:700–3. 1999.
- **Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J:** Increased risk of venous thrombosis in carriers of natural anticoagulant deficiencies. Results of the family studies of the Spanish Multicenter Study on Thrombophilia (EMET study). *Blood Coagul Fibrinolysis* 9(1): 71-78. 1998.
- **Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Bertina RM, España F:** Influence of the 4600A/G and 4678G/C polymorphisms in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene on the risk of venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden. *Thromb Haemost.* 94:389-94. 2005.

- **Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Woodhams B, Mira Y, et al:** Contribution of polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene to soluble endothelial protein C receptor and circulating activated protein C levels, and thrombotic risk. *Thromb Haemost* 91:905-11. 2004.
- **Medina P, Navarro S, Zorio E et al.** Nuevas acciones biológicas del sistema de la proteína C. *Haematologica* (Ed Española) 93 (Extra 1):161-8. 2008.
- **Meglic L, Stegnar M, Milanez T, Bozic M, Peterlin B, Peternel P, Novak-Antolic :** Factor V Leiden, prothrombin 20210G --> A, methylenetetrahydrofolate reductase 677C --> T and plasminogen activator inhibitor 4G/5G polymorphism in women with pregnancy-related venous thromboembolism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 111:157–63.2003.
- **Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR:** High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med* 342:696-701.54. 2000.
- **Monroe DM, Hoffman M:** What does it take to make a perfect clot?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:41-48. 2006.
- **Monroe DM, Roberts HR, Hoffman:** Transmission of a procoagulant signal from tissue-bearing cells to platelets. *Br J Haematol* 88:364-371. 1994.
- **Mulder R, van Schouwenburg IM, Mahmoodi BK, Mulder AB, Middeldorp S, Kluin-Nelemans HC, Lijfering WM:** Associations between high factor VIII and low free protein S levels with traditional arterial thrombotic risk factors and their risk on arterial thrombosis: results from a retrospective family cohort study. *Thromb Res* 126: 249-54, 2010.

- **Müller F, Renné T:** Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation. *Curr Opin Hematol* 15:516-21. 2008.
- **Mullis K, Faloona F, Sharf F, et al:** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273. 1986.
- **Mumford AD, McVey JH, Morse CV, Gomez K, Steen M, Norstrom EA, Tuddenham EG, Dahlback B, Bolton-Mags PH:** Factor V 1359T: a novel mutation associated with thrombosis and resistance to activated protein C. *Br J Haematol* 123: 496-501. 2003.

N

- **Nesheim M, Bajzar L.** The discovery of TAFI. *J Thromb Haemost.* 3:2139-46. 2005.

O

- **Oliver J, Monroe D, Roberts H, Hoffman M:** Thrombin activates factor XI on activated platelets in absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:170-177. 1999.
- **Orita M, Iwahana H, Kanazana H, Hayashi K, Sekiya T:** Detection of polymorphisms of human DNA by electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (86): 2766-2770. 1989.

P

- **Pabinger I, Schneider B:** GTH Study Group Natural Inhibitors: Thrombotic risk of women with hereditary antithrombin III, protein C, and protein S deficiency taking oral contraceptive medication. *Thromb Haemost* 71: 548-. 1994.
- **Paramo JA, Panizo E, Pegenaute C, Lecumberri R:** Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia. *Rev Med Univ Navarra*/vol 53, nº1, 19-23.2009.
- **PlutzkyJ, HoskinsJ, Long G, Crabtree G:** Evolution and organization of the human protein C gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 546, 1986.
- **Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM:** A common genetic variation in the 3'-untranslated region of prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88: 3698-703. 1996.
- **Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID et al:** Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 348: 913. 1996.

Q

- **Queck DL, Ng YY, Wang W, Tan AS, Tang-Lim GI, Ng IS, Law HY, Chong SS.** Rapid carrier screening for beta-thalassemia by single-step allele-specific PCR and detection. *Clin Biochem* 40: 427-430. 2007.

R

- **Raziel A, Kornberg Y, Friedler S, Schachter M, Sela BA, Ron-El R:** Hypercoagulable thrombophilic defects and hyperhomocysteinemia in patients with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 45:65–71. 2001.
- **Rees DC:** The population genetics of factor V Leiden (Arg506Gln). *Br J Haematol* 95:579-86. 1996.
- **Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, et al:** Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. On behalf of the Subcommittee on Plasma Coagulation Inhibitors of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. (Review) (112 refs). *Thromb haemost* 73:876. 1995.
- **Reuner KH, Jenetzky E, Aleu A, Litfin F, Mellado P, Kloss M, et al:** Factor XII C46T gene polymorphism and the risk of cerebral venous thrombosis. *Neurology* 70:129-32. 2008.
- **Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, Miletich JP, Malinow MR, Stampfer MJ:** Interrelation of hyperhomocysteinemia, factor V Leiden, and the risk of future venous thromboembolism. *Circulation* 95:1777-82. 1997.
- **Rijken DC, Lijnen R:** New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemostas* 7:4-13. 2009.
- **Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, and others:** Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 79: 706-8. 1998.
- **Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM,**

- Preston FE, Reitsma PH.** Geographic distribution of the prothrombin 20210G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 706.
- **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.
 - **Rosendaal FR.** High levels of factor VIII and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 83: 1-2. 2000.
 - **Rosendaal FR.** Risk factors for venous thrombosis: prevalence, risk and interaction. *Semin Hematol* 1997a; 34: 171-187.
 - **Rosendaal FR.** Thrombosis in the young epidemiology and risk factors a focus on venous thrombosis. *Thromb Haemost;* 78 :1-6. 1997b
 - **Rosendaal FR:** Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 353:1167-1173. 1999.

 - **Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J:** Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288: 321-33. 2002.

S

- **Salomon O, Steimberg DM, Zivelin A et al:** Single and combined prothrombotic factors in patient with idiopathic venous thromboembolism-prevalence and risk assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 511. 1999.

- **Santamaría A, Mateo J, Oliver A, Menéndez B, Souto JC, Borrell M, Soria JM, Tirado I, Fontcuberta J:** Risk of thrombosis associated with oral contraceptives of women from 97 families with inherited thrombophilia: high risk of thrombosis in carriers of the G20210A mutation of the prothrombin gene. *Haematologica*; 86: 965-971. 2001.
- **Saposnik B, Reny JL, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M, Gandrille S:** A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood* 103:1311-8. 2004.
- **Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH:** Plasma protein deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 64: 1297, 1984.
- **Shafey M, Anderson JL, Scarvelis D, Doucette SP, Gagnon F, Wells PS:** Factor XIII Val34Leu variant and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 97: 635-41. 2007.
- **Sibai BM:** Thrombophilias and adverse outcomes of pregnancy- what should a clinician do? *N Engl J Med* 340: 50-6. 1999.
- **Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, and others:** Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med* 158: 585-93.
- **Simmonds RE, Ireland H, Lane DA, et al:** Clarification of the risk for venous thrombosis associated with hereditary protein S deficiency by investigation of a large kindred with a characterized gene defect. *Ann Intern Med* 128:8, 1998.
- **Smigielski EM, Sirotkin K, Ward M, Sherry ST:** SNP: a database of single nucleotide polymorphism. *Nucleic Acids Res* 28: 352-55. 2000.

- **Soria JM, Almasy L, Souto JC, Buil A, Lathrop M, Blangero J, et al:** A Genome search for genetic determinants that influence fibrinogen plasma levels. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 25:1-6.43. 2005.
- **Soria JM, Fontcuberta J:** New approaches and future prospects for evaluating genetic risk of thrombosis. *Haematologica* 90:1212-22. 2005.
- **Soria JM:** El componente genético de las alteraciones de la coagulación y de la trombosis. *Rev Esp Cardiol Supl* 9: 58B-65B. 2009.
- **Soria JM:** El componente genético de las alteraciones de la coagulación y la trombosis. *Rev Esp Cardiol Supl* 9: 58B-65B. 2009.

- **Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, et al:** Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT Study. *Am J Hum Genet* 67:1452-9.11. 2000.
- **Stott MK, Fellowes AP, Upton JD, Burt MJ, George PM:** Simple multiplex PCR for the simultaneous detection of the C282Y and H63D hemochromatosis. *Clin Chem* 45: 426-428. 1999.
- **Su YN, Lee CN, Hung CC, Chen CA, Cheng WF, Tsao PN, Yu CL, Hsieh FJ.** Rapid detection of beta-globin gene (HBB) mutations coupling heteroduplex and primer-extension analysis by DHPLC. *Hum Mutat* 22: 326-336.

T

- **Talamo GP, Ibrahim S, Claxton D, Tricot GJ, Fink LM, Zangari M:** Hypercoagulable states in patients with multiple myeloma can affect the thalidomide-associated venous thromboembolism. *Blood Coagul Fibrinolysis* 20:237-9. 2009.

- **Tirado I:** Análisis de la trombofilia hereditaria: contribución de factores genéticos en la predisposición al tromboembolismo venoso en la población española. *Tesis Doctoral*. Universidad de Barcelona. 2004.
- **Tirado I, Mateo J, Soria JM, et al :** The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 345: 468-474. 2005.
- **Tirado I, Mateo J, Soria JM, Oliver A, Borrell M, Coll I, Vallve C, Souto JC, Martínez-Sánchez E, Fontcuberta J:** Contribution of prothrombin 20210A allele and factor V Leiden mutation to thrombosis risk in thrombophilic families with other hemostatic deficiencies. *Haematologica* 86:1200–8. 2001.
- **Tirado I, Soria JM, Mateo J, Oliver A, Souto JC, Santamaria A, et al:** Association after linkage analysis indicates that homozygosity for the 46C>T polymorphism in the F12 gene is a genetic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 91:899-904.2004
- **Tosetto A, Simioni M, Mateo D, Rodeghiero F:** Intraindividual consistency of the activated protein C resistance phenotype. *Br J Haematol* 126: 405-9. 2004
- **Tridapalli E, Stella M, Capretti MG, Faldella G:** Neonatal arterial iliac thrombosis in type-1 protein c deficiency: a case report. *Ital J pediatr*. Mar 8, 36:23. 2010.

V

- **Van der Bom JG, Bots ML, Haverkate F, et al:** Reduced response to activated protein C is associated with increased risk for cerebrovascular disease. *Ann Intern Med* 125:265, 1996.
- **Van Hylckama Vlieg A, Van der Linden IK, Bertina RM, Rosendaal FR:** High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 95:3678-82.2000.
- **Vanderbroucke JP, Hermerhorst FM:** Risk of venous thrombosis with hormone-replacement therapy. *Lancet* 348: 981. 1996.
- **Veljković M, Popovc J:** Venous thromboembolism and oral contraception. *Med Pregl* 63: 376-9. 2010.
- **Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, et al:** The sequence of human genome. *Science* 291: 1034-1351. 2001.
- **Vokó Z, Berczky Z, Katona E, Adány R, Muszbek L:** Factor XIII Val34Leu variant protects against coronary artery disease. A meta-analysis. *Thromb Haemost* 97: 458-63. 2007.

W

- **Wells PS, Anderson JL, Scarvelis D, Doucette SP, Gagnon F:** Factor XIII Val34Leu variant is protective against venous thromboembolism: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 164: 101-9. 2006.
- **Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T:** Factor V Cambridge mutation and activated protein C resistance assays. *Thromb Haemost* 95: 581-3. 1998.

Z

- **Zivelin A, Griffin JH, Xu X, et al:** A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood* 89:397, 1997.
- **Zoller B, Dahlback B:** Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* 343:1536-8. 1994.

ANEXO RESULTADOS

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1.	NPM	HT	HT	NPM
2.	NPM	NPM	HOM	NPM
3.	NPM	NPM	HT	NPM
4.	*	HT	HOM	NPM
5.	NPM	NPM	HT	NPM
6.	HT	NPM	HT	NPM
7.	NPM	NPM	HOM	HOM
8.	NPM	NPM	NPM	NPM
9.	NPM	HT	NPM	HT
10.	NPM	NPM	HT	NPM
11.	NPM	NPM	NPM	HOM
12.	NPM	HT	NPM	*
13.	NPM	HT	HOM	HT
14.	NPM	HT	HOM	HT
15.	NPM	NPM	HT	NPM
16.	NPM	NPM	NPM	NPM
17.	NPM	HT	NPM	NPM
18.	NPM	NPM	HT	NPM
19.	NPM	NPM	HT	*
20.	NPM	NPM	*	*
21.	NPM	*	*	*
22.	NPM	NPM	HT	*
23.	HT	NPM	HOM	NPM
24.	NPM	NPM	HT	NPM
25.	NPM	NPM	HT	NPM
26.	NPM	NPM	NPM	NPM
27.	NPM	NPM	HT	NPM
28.	NPM	NPM	HT	NPM
29.	NPM	NPM	NPM	NPM
30.	NPM	NPM	HT	NPM
31.	NPM	NPM	HT	HT
32.	NPM	HT	HOM	HT
33.	NPM	NPM	NPM	HT
34.	NPM	HT	NPM	NPM
35.	NPM	NPM	HT	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
36.	HT	NPM	HT	NPM
37.	NPM	NPM	HT	NPM
38.	HT	NPM	NPM	NPM
39.	NPM	NPM	NPM	HT
40.	NPM	NPM	HOM	HT
41.	*	NPM	HT	HT
42.	NPM	NPM	HT	NPM
43.	NPM	NPM	HT	NPM
44.	NPM	NPM	NPM	NPM
45.	NPM	NPM	NPM	HT
46.	NPM	NPM	HOM	NPM
47.	NPM	NPM	NPM	NPM
48.	NPM	HT	NPM	HT
49.	NPM	NPM	HT	NPM
50.	NPM	NPM	NPM	HT
51.	NPM	NPM	NPM	HT
52.	NPM	NPM	NPM	NPM
53.	NPM	NPM	NPM	HT
54.	NPM	NPM	NPM	HT
55.	NPM	NPM	NPM	HT
56.	NPM	NPM	HOM	HOM
57.	NPM	HT	NPM	NPM
58.	NPM	NPM	HT	HT
59.	NPM	NPM	HOM	NPM
60.	HT	NPM	HOM	NPM
61.	NPM	NPM	HOM	HOM
62.	HT	NPM	HOM	NPM
63.	NPM	NPM	HOM	NPM
64.	NPM	NPM	NPM	NPM
65.	NPM	HT	HOM	NPM
66.	NPM	HT	HT	HT
67.	NPM	HT	HT	NPM
68.	NPM	NPM	HT	NPM
69.	NPM	NPM	NPM	HT
70.	NPM	NPM	NPM	NPM

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
71.	NPM	NPM	HOM	NPM
72.	NPM	NPM	HT	NPM
73.	NPM	NPM	HT	NPM
74.	NPM	NPM	NPM	NPM
75.	NPM	HT	HT	NPM
76.	NPM	NPM	HT	NPM
77.	HT	NPM	HT	NPM
78.	NPM	NPM	NPM	NPM
79.	NPM	NPM	NPM	NPM
80.	NPM	HT	HOM	HT
81.	NPM	NPM	HT	NPM
82.	NPM	NPM	HT	HT
83.	NPM	NPM	HT	HT
84.	NPM	NPM	HT	NPM
85.	NPM	NPM	HT	NPM
86.	NPM	NPM	NPM	HT
87.	NPM	NPM	NPM	NPM
88.	NPM	HT	NPM	NPM
89.	NPM	NPM	HT	HT
90.	NPM	NPM	NPM	NPM
91.	NPM	NPM	HT	NPM
92.	NPM	NPM	HT	HT
93.	NPM	NPM	NPM	NPM
94.	NPM	NPM	HT	NPM
95.	NPM	NPM	HT	NPM
96.	NPM	NPM	HT	NPM
97.	NPM	HT	NPM	HT
98.	HT	NPM	HT	NPM
99.	NPM	NPM	NPM	NPM
100.	NPM	NPM	HT	NPM
101.	NPM	NPM	HT	NPM
102.	NPM	NPM	HOM	NPM
103.	NPM	HT	HT	HT
104.	HT	NPM	NPM	NPM
105.	HT	NPM	HOM	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
106.	NPM	NPM	NPM	NPM
107.	NPM	NPM	HOM	NPM
108.	NPM	NPM	NPM	HT
109.	NPM	NPM	HT	NPM
110.	NPM	NPM	HOM	NPM
111.	NPM	NPM	NPM	NPM
112.	NPM	NPM	NPM	NPM
113.	NPM	NPM	HT	NPM
114.	NPM	NPM	HT	NPM
115.	NPM	NPM	HT	NPM
116.	NPM	NPM	HOM	NPM
117.	NPM	NPM	HT	NPM
118.	NPM	NPM	NPM	NPM
119.	NPM	NPM	NPM	NPM
120.	NPM	NPM	HT	HT
121.	NPM	NPM	HT	HT
122.	NPM	NPM	HT	HT
123.	NPM	HT	HT	HT
124.	HT	HT	HT	NPM
125.	NPM	NPM	HT	HOM
126.	NPM	NPM	HT	HT
127.	NPM	NPM	HT	HT
128.	NPM	NPM	HT	HT
129.	NPM	NPM	NPM	HT
130.	NPM	NPM	NPM	NPM
131.	NPM	NPM	HT	NPM
132.	NPM	NPM	NPM	NPM
133.	NPM	NPM	HT	HT
134.	NPM	NPM	HT	HT
135.	NPM	NPM	NPM	NPM
136.	NPM	NPM	HT	HT
137.	NPM	NPM	HOM	NPM
138.	NPM	NPM	HOM	NPM
139.	NPM	NPM	HT	NPM
140.	NPM	NPM	HT	NPM

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
141.	NPM	NPM	HT	NPM
142.	NPM	NPM	HOM	HT
143.	NPM	NPM	NPM	HT
144.	NPM	NPM	HOM	NPM
145.	NPM	NPM	HT	NPM
146.	NPM	NPM	HT	HT
147.	NPM	NPM	NPM	NPM
148.	NPM	NPM	HOM	HT
149.	NPM	NPM	HT	HT
150.	NPM	NPM	HT	HT
151.	NPM	NPM	HOM	HT
152.	NPM	NPM	HT	HT
153.	NPM	NPM	HOM	HT
154.	NPM	NPM	HT	HT
155.	NPM	NPM	HOM	NPM
156.	NPM	NPM	NPM	NPM
157.	NPM	NPM	NPM	NPM
158.	NPM	HT	NPM	HOM
159.	NPM	NPM	NPM	NPM
160.	NPM	NPM	NPM	HT
161.	NPM	NPM	HOM	HT
162.	NPM	NPM	HT	HT
163.	HT	NPM	HT	NPM
164.	NPM	NPM	NPM	NPM
165.	NPM	NPM	HOM	NPM
166.	NPM	NPM	HT	NPM
167.	NPM	NPM	NPM	HT
168.	NPM	NPM	HT	HT
169.	NPM	NPM	NPM	NPM
170.	NPM	NPM	HT	HT
171.	NPM	NPM	NPM	NPM
172.	NPM	NPM	NPM	NPM
173.	NPM	NPM	HT	NPM
174.	NPM	NPM	HT	NPM
175.	NPM	NPM	HT	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
176.	NPM	HT	NPM	NPM
177.	NPM	NPM	HT	NPM
178.	NPM	NPM	HT	HOM
179.	NPM	NPM	HT	NPM
180.	NPM	NPM	HT	NPM
181.	HT	NPM	NPM	HT
182.	NPM	NPM	HT	NPM
183.	NPM	NPM	HT	NPM
184.	NPM	NPM	HT	NPM
185.	NPM	NPM	NPM	NPM
186.	NPM	NPM	NPM	HT
187.	NPM	NPM	NPM	HOM
188.	NPM	NPM	HT	NPM
189.	NPM	NPM	NPM	NPM
190.	NPM	NPM	NPM	HOM
191.	HT	NPM	NPM	HT
192.	NPM	NPM	NPM	HT
193.	NPM	NPM	HT	NPM
194.	NPM	NPM	HT	NPM
195.	NPM	NPM	HT	NPM
196.	NPM	NPM	HT	NPM
197.	NPM	NPM	HT	NPM
198.	NPM	HT	HT	NPM
199.	NPM	NPM	HT	NPM
200.	NPM	NPM	NPM	HT
201.	NPM	NPM	HT	NPM
202.	NPM	NPM	HT	HT
203.	NPM	NPM	NPM	NPM
204.	HT	NPM	NPM	NPM
205.	NPM	NPM	NPM	NPM
206.	NPM	NPM	NPM	HT
207.	NPM	NPM	NPM	NPM
208.	NPM	HT	HOM	HT
209.	NPM	NPM	HOM	HT
210.	NPM	NPM	HT	NPM

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
211.	NPM	NPM	NPM	NPM
212.	NPM	NPM	HT	NPM
213.	NPM	NPM	HT	NPM
214.	NPM	NPM	HT	HT
215.	NPM	NPM	HOM	HT
216.	NPM	NPM	NPM	HT
217.	NPM	NPM	NPM	NPM
218.	NPM	NPM	HOM	HT
219.	NPM	NPM	HT	NPM
220.	NPM	NPM	HOM	NPM
221.	NPM	NPM	HT	NPM
222.	NPM	HT	HT	HT
223.	NPM	NPM	NPM	HT
224.	NPM	NPM	HT	NPM
225.	NPM	NPM	HOM	NPM
226.	NPM	NPM	HT	HT
227.	NPM	NPM	NPM	HT
228.	NPM	HT	HT	NPM
229.	NPM	NPM	HOM	NPM
230.	NPM	NPM	NPM	NPM
231.	NPM	HT	HOM	NPM
232.	NPM	NPM	HOM	NPM
233.	NPM	NPM	HT	NPM
234.	NPM	NPM	HOM	NPM
235.	NPM	NPM	HT	NPM
236.	NPM	NPM	HT	NPM
237.	NPM	NPM	HT	HT
238.	NPM	NPM	HT	HT
239.	NPM	NPM	NPM	HT
240.	NPM	NPM	HOM	HT
241.	NPM	NPM	NPM	NPM
242.	HT	HOM	NPM	NPM
243.	NPM	NPM	NPM	NPM
244.	NPM	NPM	NPM	HT
245.	NPM	NPM	HT	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
246.	NPM	NPM	NPM	HT
247.	NPM	HT	HOM	NPM
248.	NPM	NPM	HT	NPM
249.	NPM	HT	HT	NPM
250.	NPM	NPM	HT	NPM
251.	NPM	NPM	HOM	HOM
252.	NPM	HT	HT	HOM
253.	NPM	NPM	NPM	NPM
254.	NPM	NPM	HOM	HT
255.	NPM	NPM	NPM	NPM
256.	NPM	NPM	HT	HT
257.	NPM	NPM	HT	NPM
258.	NPM	NPM	HT	HT
259.	NPM	NPM	NPM	NPM
260.	NPM	NPM	HT	NPM
261.	NPM	HT	HT	NPM
262.	NPM	HT	HT	NPM
263.	NPM	NPM	HT	HT
264.	NPM	NPM	HT	NPM
265.	NPM	NPM	NPM	HT
266.	NPM	NPM	HT	HT
267.	NPM	NPM	HOM	HT
268.	NPM	HT	HOM	HT
269.	NPM	NPM	HOM	HT
270.	NPM	NPM	HOM	HT
271.	NPM	NPM	HOM	NPM
272.	NPM	NPM	NPM	HT
273.	NPM	NPM	NPM	HT
274.	NPM	NPM	HT	NPM
275.	NPM	NPM	NPM	HT
276.	NPM	NPM	HT	HT
277.	NPM	NPM	HT	NPM
278.	NPM	NPM	HT	NPM
279.	NPM	HT	NPM	HT
280.	NPM	NPM	HT	HOM

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
281.	NPM	NPM	NPM	NPM
282.	NPM	NPM	HOM	NPM
283.	NPM	NPM	HT	NPM
284.	NPM	NPM	NPM	HT
285.	NPM	NPM	NPM	NPM
286.	NPM	NPM	HT	NPM
287.	NPM	NPM	HT	NPM
288.	NPM	HT	HT	NPM
289.	HT	NPM	HT	NPM
290.	NPM	NPM	NPM	HT
291.	NPM	NPM	NPM	HT
292.	NPM	NPM	HOM	NPM
293.	NPM	NPM	HT	NPM
294.	NPM	NPM	NPM	HT
295.	NPM	NPM	HT	HT
296.	NPM	NPM	HT	NPM
297.	NPM	NPM	HOM	HT
298.	NPM	HT	HOM	NPM
299.	NPM	NPM	HT	HOM
300.	NPM	NPM	HT	NPM
301.	NPM	NPM	HOM	NPM
302.	NPM	NPM	HT	NPM
303.	NPM	NPM	HOM	NPM
304.	NPM	NPM	NPM	NPM
305.	HT	NPM	HT	NPM
306.	NPM	NPM	HT	NPM
307.	NPM	NPM	NPM	HOM
308.	HT	NPM	NPM	HT
309.	NPM	NPM	HOM	HT
310.	NPM	NPM	NPM	HT
311.	NPM	NPM	HT	HT
312.	HT	NPM	HT	NPM
313.	NPM	NPM	NPM	HT
314.	NPM	NPM	HT	NPM
315.	NPM	NPM	HOM	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
316.	NPM	NPM	NPM	NPM
317.	NPM	NPM	NPM	NPM
318.	NPM	NPM	HT	NPM
319.	NPM	NPM	NPM	HT
320.	NPM	NPM	NPM	NPM
321.	NPM	HT	NPM	NPM
322.	NPM	NPM	NPM	NPM
323.	NPM	NPM	HT	NPM
324.	HT	NPM	HOM	NPM
325.	HT	NPM	HT	HT
326.	NPM	NPM	HT	HT
327.	NPM	NPM	NPM	NPM
328.	NPM	NPM	NPM	NPM
329.	NPM	NPM	HT	NPM
330.	NPM	NPM	NPM	NPM
331.	NPM	NPM	NPM	HT
332.	NPM	NPM	HT	NPM
333.	NPM	NPM	HOM	NPM
334.	HT	NPM	NPM	HT
335.	NPM	NPM	HT	NPM
336.	NPM	NPM	NPM	NPM
337.	NPM	NPM	NPM	NPM
338.	NPM	HT	HT	NPM
339.	NPM	NPM	HT	NPM
340.	NPM	NPM	HOM	NPM
341.	HT	NPM	HT	NPM
342.	NPM	NPM	HT	HT
343.	NPM	NPM	NPM	HT
344.	NPM	NPM	HT	NPM
345.	NPM	NPM	HOM	NPM
346.	NPM	NPM	HOM	NPM
347.	NPM	NPM	HOM	NPM
348.	NPM	NPM	NPM	NPM
349.	NPM	NPM	HOM	HT
350.	NPM	NPM	NPM	HT

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
351.	HT	NPM	NPM	NPM
352.	NPM	NPM	NPM	NPM
353.	NPM	NPM	HT	NPM
354.	NPM	HT	HOM	NPM
355.	NPM	NPM	HT	HT
356.	NPM	NPM	NPM	NPM
357.	NPM	NPM	HOM	NPM
358.	NPM	NPM	HT	NPM
359.	NPM	NPM	HT	HT
360.	NPM	NPM	HT	NPM
361.	NPM	NPM	HT	HT
362.	NPM	NPM	HT	HT
363.	NPM	NPM	HOM	HT
364.	NPM	NPM	HOM	HT
365.	NPM	NPM	HOM	HOM
366.	NPM	NPM	HT	NPM
367.	NPM	NPM	HT	NPM
368.	NPM	NPM	HT	NPM
369.	NPM	HT	HT	NPM
370.	NPM	NPM	NPM	NPM
371.	NPM	NPM	HOM	NPM
372.	NPM	NPM	HT	NPM
373.	NPM	NPM	NPM	NPM
374.	NPM	NPM	HT	HT
375.	NPM	NPM	HT	NPM
376.	NPM	NPM	HT	NPM
377.	NPM	NPM	NPM	NPM
378.	NPM	HT	NPM	NPM
379.	NPM	NPM	NPM	NPM
380.	NPM	NPM	HT	NPM
381.	NPM	NPM	HOM	HT
382.	HT	HT	NPM	NPM
383.	NPM	NPM	HOM	NPM
384.	NPM	NPM	HT	HT
385.	NPM	NPM	NPM	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
386.	NPM	NPM	HT	NPM
387.	NPM	NPM	NPM	NPM
388.	NPM	NPM	HT	NPM
389.	NPM	NPM	HT	HT
390.	NPM	NPM	HOM	NPM
391.	NPM	NPM	HOM	HT
392.	NPM	NPM	HOM	NPM
393.	NPM	NPM	NPM	NPM
394.	NPM	NPM	NPM	NPM
395.	NPM	NPM	HT	NPM
396.	NPM	NPM	HT	NPM
397.	NPM	NPM	HT	HT
398.	NPM	HT	HT	HOM
399.	NPM	HT	HT	HT
400.	NPM	NPM	HT	HOM
401.	NPM	NPM	HOM	NPM
402.	NPM	NPM	NPM	NPM
403.	NPM	NPM	NPM	NPM
404.	NPM	NPM	HT	HT
405.	NPM	NPM	HT	HT
406.	NPM	NPM	HT	NPM
407.	NPM	NPM	HT	HT
408.	NPM	NPM	HOM	NPM
409.	NPM	NPM	HOM	NPM
410.	NPM	NPM	NPM	HOM
411.	NPM	NPM	HOM	NPM
412.	NPM	NPM	HT	HT
413.	NPM	NPM	NPM	HT
414.	NPM	NPM	HOM	HT
415.	NPM	NPM	HT	NPM
416.	NPM	NPM	HT	HT
417.	NPM	NPM	NPM	NPM
418.	NPM	NPM	HT	NPM
419.	NPM	NPM	HT	NPM
420.	NPM	NPM	HT	NPM

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
421.	NPM	NPM	HT	NPM
422.	NPM	NPM	HT	NPM
423.	NPM	NPM	NPM	NPM
424.	NPM	NPM	NPM	HT
425.	NPM	NPM	NPM	HT
426.	NPM	NPM	HT	HOM
427.	NPM	NPM	HT	HT
428.	NPM	HT	HT	NPM
429.	NPM	NPM	HOM	NPM
430.	NPM	NPM	HT	NPM
431.	NPM	NPM	HOM	NPM
432.	NPM	NPM	NPM	NPM
433.	NPM	NPM	HT	NPM
434.	NPM	NPM	HT	NPM
435.	NPM	NPM	HT	NPM
436.	NPM	NPM	HT	NPM
437.	NPM	NPM	HT	NPM
438.	NPM	NPM	HOM	NPM
439.	NPM	NPM	NPM	NPM
440.	NPM	NPM	HOM	NPM
441.	NPM	NPM	HT	NPM
442.	NPM	NPM	HOM	NPM
443.	NPM	NPM	NPM	NPM
444.	NPM	NPM	HT	HT
445.	NPM	NPM	HT	NPM
446.	NPM	NPM	HOM	HT
447.	NPM	HT	NPM	NPM
448.	NPM	HT	NPM	NPM
449.	NPM	NPM	HT	NPM
450.	NPM	NPM	HOM	NPM
451.	NPM	NPM	HOM	HT
452.	NPM	NPM	HOM	NPM
453.	NPM	NPM	NPM	NPM
454.	NPM	NPM	HOM	NPM
455.	NPM	NPM	HT	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
456.	NPM	NPM	NPM	NPM
457.	NPM	NPM	HT	NPM
458.	NPM	NPM	HOM	NPM
459.	NPM	NPM	HOM	NPM
460.	NPM	NPM	HOM	NPM
461.	NPM	NPM	HOM	NPM
462.	NPM	NPM	NPM	HT
463.	NPM	NPM	HOM	NPM
464.	NPM	NPM	HT	NPM
465.	NPM	NPM	NPM	NPM
466.	NPM	NPM	HOM	HT
467.	NPM	NPM	HT	NPM
468.	NPM	NPM	HT	NPM
469.	NPM	NPM	NPM	HT
470.	NPM	NPM	HOM	HT
471.	NPM	NPM	HOM	NPM
472.	NPM	HT	HT	NPM
473.	NPM	NPM	HOM	NPM
474.	NPM	NPM	HT	NPM
475.	NPM	NPM	HT	NPM
476.	NPM	NPM	HT	NPM
477.	NPM	HT	NPM	NPM
478.	NPM	NPM	NPM	NPM
479.	NPM	HT	HT	HT
480.	NPM	NPM	NPM	HT
481.	NPM	NPM	NPM	NPM
482.	HT	NPM	HT	NPM
483.	NPM	NPM	HOM	HT
484.	NPM	NPM	HT	NPM
485.	NPM	NPM	NPM	NPM
486.	NPM	NPM	HOM	NPM
487.	NPM	NPM	HT	NPM
488.	NPM	NPM	HT	NPM
489.	NPM	NPM	NPM	HT
490.	NPM	NPM	NPM	HT

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
491.	NPM	NPM	NPM	NPM
492.	NPM	NPM	NPM	HT
493.	NPM	NPM	HT	HOM
494.	HT	NPM	HT	NPM
495.	NPM	HT	NPM	HT
496.	NPM	NPM	NPM	NPM
497.	NPM	NPM	NPM	HT
498.	NPM	NPM	HT	NPM
499.	NPM	NPM	HOM	NPM
500.	NPM	NPM	HT	HOM
501.	NPM	NPM	HT	NPM
502.	NPM	NPM	HT	NPM
503.	NPM	NPM	NPM	HT
504.	NPM	HT	NPM	NPM
505.	NPM	NPM	HT	NPM
506.	NPM	NPM	HT	NPM
507.	NPM	NPM	HT	NPM
508.	NPM	NPM	NPM	HT
509.	NPM	NPM	HOM	NPM
510.	NPM	NPM	HT	NPM
511.	NPM	NPM	HT	NPM
512.	NPM	NPM	NPM	HT
513.	NPM	NPM	HOM	NPM
514.	NPM	NPM	HT	NPM
515.	NPM	NPM	HT	NPM
516.	NPM	NPM	NPM	HT
517.	NPM	NPM	NPM	NPM
518.	NPM	NPM	HOM	HT
519.	NPM	NPM	HOM	HT
520.	HT	NPM	HT	HOM
521.	NPM	NPM	HT	NPM
522.	HT	NPM	HT	HT
523.	HT	NPM	NPM	HT
524.	NPM	NPM	NPM	HT
525.	NPM	NPM	NPM	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
526.	NPM	NPM	HT	NPM
527.	NPM	NPM	HT	HT
528.	NPM	NPM	HOM	NPM
529.	HT	HT	HOM	NPM
530.	NPM	HT	NPM	NPM
531.	NPM	NPM	HT	NPM
532.	NPM	NPM	HT	NPM
533.	HT	NPM	NPM	NPM
534.	NPM	NPM	HOM	NPM
535.	NPM	NPM	HOM	NPM
536.	NPM	NPM	HT	NPM
537.	NPM	NPM	HT	NPM
538.	NPM	HT	HT	NPM
539.	NPM	NPM	NPM	NPM
540.	NPM	HT	NPM	HT
541.	NPM	NPM	HOM	NPM
542.	NPM	NPM	HT	NPM
543.	HT	NPM	HOM	NPM
544.	NPM	NPM	HT	HT
545.	NPM	NPM	NPM	NPM
546.	NPM	NPM	HOM	NPM
547.	NPM	NPM	HT	NPM
548.	NPM	NPM	HT	HT
549.	NPM	NPM	HOM	HT
550.	NPM	NPM	HOM	NPM
551.	NPM	NPM	HOM	NPM
552.	NPM	NPM	HOM	HT
553.	NPM	NPM	HT	HT
554.	NPM	NPM	HOM	NPM
555.	NPM	HT	HT	HT
556.	HT	NPM	NPM	NPM
557.	NPM	NPM	HOM	HT
558.	NPM	NPM	HT	NPM
559.	NPM	NPM	HOM	NPM
560.	NPM	NPM	NPM	NPM

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
561.	NPM	NPM	HT	HT
562.	NPM	NPM	NPM	NPM
563.	NPM	NPM	HT	HT
564.	NPM	NPM	NPM	NPM
565.	NPM	NPM	HT	NPM
566.	NPM	NPM	HOM	HT
567.	NPM	NPM	HT	NPM
568.	NPM	NPM	NPM	HT
569.	NPM	NPM	NPM	NPM
570.	NPM	NPM	NPM	NPM
571.	NPM	NPM	NPM	NPM
572.	NPM	NPM	NPM	HT
573.	NPM	NPM	NPM	NPM
574.	NPM	NPM	HT	NPM
575.	NPM	NPM	NPM	NPM
576.	NPM	NPM	HOM	HT
577.	NPM	NPM	NPM	NPM
578.	NPM	NPM	HT	NPM
579.	NPM	NPM	HT	NPM
580.	NPM	NPM	NPM	NPM
581.	NPM	NPM	HOM	HT
582.	NPM	NPM	HT	NPM
583.	NPM	NPM	HT	HT
584.	NPM	NPM	HOM	NPM
585.	NPM	NPM	NPM	NPM
586.	NPM	NPM	HT	NPM
587.	NPM	NPM	NPM	NPM
588.	NPM	NPM	HOM	HT
589.	NPM	HT	HT	NPM
590.	NPM	NPM	HOM	NPM
591.	NPM	NPM	NPM	NPM
592.	NPM	NPM	HT	HT
593.	NPM	NPM	HT	HT
594.	NPM	NPM	NPM	NPM
595.	NPM	NPM	HT	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
596.	HT	NPM	NPM	HT
597.	NPM	NPM	HT	NPM
598.	NPM	NPM	HOM	NPM
599.	NPM	NPM	HT	HT
600.	NPM	NPM	HOM	NPM
601.	NPM	NPM	HT	NPM
602.	NPM	HT	HT	NPM
603.	NPM	NPM	HT	HT
604.	NPM	NPM	HOM	NPM
605.	NPM	NPM	HT	HT
606.	NPM	HT	HOM	NPM
607.	NPM	NPM	HOM	NPM
608.	NPM	HT	HT	NPM
609.	NPM	HT	NPM	NPM
610.	NPM	HT	HT	HT
611.	NPM	NPM	HT	HT
612.	NPM	NPM	NPM	NPM
613.	NPM	NPM	NPM	NPM
614.	NPM	HT	HT	HT
615.	NPM	NPM	HT	HT
616.	NPM	NPM	NPM	NPM
617.	NPM	NPM	HT	NPM
618.	NPM	HT	HT	NPM
619.	NPM	NPM	HOM	HT
620.	NPM	NPM	HT	HT
621.	NPM	NPM	HT	NPM
622.	NPM	NPM	NPM	HT
623.	NPM	NPM	HT	NPM
624.	NPM	NPM	HOM	NPM
625.	NPM	NPM	HT	HT
626.	NPM	NPM	HT	NPM
627.	NPM	NPM	HOM	HT
628.	HT	NPM	HOM	HT
629.	NPM	NPM	NPM	NPM
630.	NPM	NPM	NPM	NPM

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
631.	NPM	NPM	NPM	NPM
632.	NPM	NPM	HOM	NPM
633.	HT	NPM	NPM	NPM
634.	NPM	NPM	HT	NPM
635.	NPM	NPM	NPM	HT
636.	NPM	NPM	HT	NPM
637.	NPM	NPM	HT	NPM
638.	NPM	NPM	HOM	HT
639.	NPM	NPM	NPM	HT
640.	NPM	NPM	HT	NPM
641.	NPM	NPM	HT	NPM
642.	NPM	NPM	NPM	NPM
643.	HT	NPM	HT	NPM
644.	NPM	NPM	HT	HT
645.	NPM	NPM	NPM	NPM
646.	NPM	NPM	HT	NPM
647.	NPM	NPM	HOM	NPM
648.	NPM	NPM	HOM	HT
649.	NPM	NPM	HT	NPM
650.	NPM	NPM	HT	NPM
651.	NPM	NPM	HT	NPM
652.	NPM	NPM	HT	NPM
653.	NPM	NPM	NPM	NPM
654.	NPM	NPM	NPM	NPM
655.	NPM	HT	HT	HT
656.	NPM	NPM	HT	HT
657.	NPM	NPM	HOM	NPM
658.	NPM	NPM	HT	HT
659.	NPM	NPM	HT	NPM
660.	NPM	NPM	HOM	NPM
661.	NPM	NPM	HT	NPM
662.	NPM	NPM	HT	NPM
663.	NPM	NPM	HT	HT
664.	NPM	NPM	HOM	NPM
665.	NPM	NPM	HT	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
666.	NPM	NPM	NPM	NPM
667.	NPM	NPM	HT	NPM
668.	NPM	NPM	NPM	NPM
669.	NPM	NPM	HT	HT
670.	HT	NPM	HT	NPM
671.	NPM	HOM	NPM	NPM
672.	NPM	NPM	HT	NPM
673.	NPM	NPM	NPM	NPM
674.	NPM	NPM	HOM	NPM
675.	NPM	NPM	HT	NPM
676.	NPM	NPM	HT	NPM
677.	NPM	NPM	HOM	NPM
678.	NPM	NPM	NPM	HT
679.	NPM	NPM	HT	HT
680.	HT	NPM	NPM	NPM
681.	NPM	NPM	NPM	HT
682.	NPM	NPM	HT	NPM
683.	NPM	NPM	NPM	NPM
684.	NPM	NPM	HT	NPM
685.	NPM	NPM	NPM	NPM
686.	NPM	NPM	HOM	NPM
687.	NPM	HT	HT	HT
688.	NPM	HT	HOM	NPM
689.	NPM	NPM	HOM	NPM
690.	NPM	NPM	HT	NPM
691.	NPM	NPM	HT	HT
692.	NPM	NPM	HT	NPM
693.	NPM	NPM	HT	NPM
694.	NPM	NPM	NPM	HT
695.	HT	NPM	HOM	HOM
696.	NPM	HT	HT	NPM
697.	NPM	NPM	HOM	NPM
698.	NPM	NPM	NPM	HT
699.	NPM	NPM	HT	NPM
700.	NPM	NPM	HT	NPM

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
701.	NPM	NPM	NPM	NPM
702.	NPM	NPM	HT	NPM
703.	NPM	NPM	HT	NPM
704.	NPM	NPM	HT	NPM
705.	NPM	NPM	HOM	NPM
706.	NPM	NPM	HT	NPM
707.	NPM	NPM	HT	NPM
708.	NPM	NPM	HT	NPM
709.	NPM	NPM	HT	NPM
710.	NPM	HT	HT	NPM
711.	NPM	HT	HT	NPM
712.	NPM	HT	HOM	NPM
713.	NPM	NPM	HOM	NPM
714.	NPM	NPM	HT	NPM
715.	NPM	NPM	HOM	NPM
716.	NPM	NPM	HT	NPM
717.	NPM	NPM	HOM	NPM
718.	NPM	NPM	HOM	NPM
719.	NPM	NPM	HOM	HT
720.	NPM	NPM	NPM	NPM
721.	HT	NPM	HOM	NPM
722.	NPM	NPM	HOM	HOM
723.	NPM	NPM	NPM	NPM
724.	NPM	NPM	NPM	HT
725.	NPM	NPM	HT	HT
726.	NPM	NPM	NPM	HOM
727.	NPM	NPM	HT	NPM
728.	NPM	NPM	HT	HT
729.	NPM	NPM	HOM	NPM
730.	NPM	NPM	NPM	HT
731.	NPM	HT	HOM	NPM
732.	NPM	NPM	HT	NPM
733.	NPM	NPM	NPM	HT
734.	NPM	NPM	NPM	HT
735.	NPM	NPM	NPM	HT

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
736.	NPM	NPM	HOM	NPM
737.	NPM	NPM	HT	NPM
738.	NPM	NPM	HT	NPM
739.	NPM	NPM	NPM	HT
740.	NPM	NPM	HT	NPM
741.	NPM	NPM	HOM	HT
742.	NPM	NPM	HOM	HT
743.	NPM	NPM	HT	NPM
744.	NPM	NPM	HOM	NPM
745.	NPM	NPM	HOM	HT
746.	NPM	NPM	NPM	HT
747.	NPM	NPM	NPM	NPM
748.	NPM	NPM	HOM	NPM
749.	NPM	NPM	HOM	NPM
750.	NPM	NPM	HOM	HT
751.	NPM	NPM	HT	HT
752.	NPM	NPM	HOM	HT
753.	NPM	NPM	NPM	NPM
754.	NPM	NPM	HOM	NPM
755.	NPM	NPM	NPM	NPM
756.	NPM	NPM	NPM	HT
757.	NPM	NPM	HT	HT
758.	NPM	HT	HOM	NPM
759.	NPM	NPM	NPM	NPM
760.	HT	HT	HOM	HT
761.	NPM	NPM	NPM	NPM
762.	NPM	NPM	HT	NPM
763.	NPM	NPM	NPM	NPM
764.	NPM	NPM	HT	NPM
765.	NPM	HT	HT	NPM
766.	NPM	NPM	HT	NPM
767.	HT	NPM	HT	NPM
768.	NPM	NPM	HOM	HT
769.	NPM	NPM	HOM	HT
770.	NPM	NPM	HT	NPM

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
771.	NPM	NPM	HOM	NPM
772.	NPM	NPM	HOM	NPM
773.	NPM	NPM	HT	NPM
774.	NPM	NPM	HT	NPM
775.	NPM	NPM	HT	NPM
776.	HT	NPM	HT	HT
777.	NPM	NPM	HOM	NPM
778.	NPM	NPM	NPM	NPM
779.	NPM	HT	NPM	NPM
780.	NPM	NPM	NPM	HT
781.	NPM	NPM	HT	NPM
782.	NPM	NPM	NPM	NPM
783.	NPM	NPM	HT	NPM
784.	NPM	NPM	HOM	HT
785.	NPM	NPM	HT	HT
786.	NPM	NPM	NPM	NPM
787.	NPM	NPM	HT	NPM
788.	NPM	NPM	HT	NPM
789.	NPM	NPM	HT	NPM
790.	NPM	NPM	HOM	HT
791.	NPM	NPM	HT	HT
792.	NPM	NPM	HOM	NPM
793.	NPM	NPM	NPM	NPM
794.	NPM	NPM	HT	HT
795.	NPM	NPM	HOM	NPM
796.	NPM	HT	NPM	NPM
797.	NPM	NPM	HT	HT
798.	NPM	NPM	HT	NPM
799.	NPM	NPM	NPM	NPM
800.	NPM	NPM	NPM	NPM
801.	NPM	NPM	HT	HT
802.	NPM	NPM	HT	HT
803.	NPM	NPM	NPM	HT
804.	NPM	NPM	HT	NPM
805.	NPM	NPM	HOM	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
806.	NPM	NPM	HOM	HT
807.	NPM	NPM	HOM	NPM
808.	NPM	NPM	NPM	HT
809.	NPM	HT	HT	HT
810.	NPM	NPM	NPM	HT
811.	HT	NPM	HT	HT
812.	NPM	NPM	HOM	HT
813.	NPM	HOM	HT	NPM
814.	NPM	NPM	HT	NPM
815.	NPM	NPM	HT	NPM
816.	NPM	NPM	HT	NPM
817.	NPM	NPM	HT	NPM
818.	NPM	NPM	HT	NPM
819.	NPM	NPM	HOM	NPM
820.	NPM	NPM	NPM	NPM
821.	NPM	NPM	NPM	NPM
822.	NPM	NPM	NPM	HT
823.	NPM	NPM	NPM	HOM
824.	NPM	NPM	HT	NPM
825.	HT	NPM	HT	NPM
826.	NPM	NPM	HT	HT
827.	NPM	HT	HOM	HT
828.	NPM	NPM	HT	NPM
829.	NPM	NPM	HT	HT
830.	NPM	NPM	NPM	NPM
831.	NPM	NPM	HT	NPM
832.	NPM	HT	HOM	HT
833.	HT	NPM	HT	NPM
834.	NPM	HT	HT	NPM
835.	NPM	NPM	HT	HT
836.	NPM	NPM	HOM	HT
837.	NPM	HT	HT	NPM
838.	NPM	NPM	NPM	HT
839.	NPM	NPM	HOM	NPM
840.	HT	NPM	NPM	NPM

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
841.	NPM	NPM	NPM	HT
842.	HT	NPM	HOM	NPM
843.	NPM	NPM	HT	HT
844.	NPM	NPM	NPM	NPM
845.	NPM	NPM	HT	HT
846.	NPM	NPM	HOM	NPM
847.	NPM	NPM	HT	NPM
848.	NPM	NPM	HT	HT
849.	NPM	NPM	HT	HT
850.	NPM	NPM	HT	HT
851.	NPM	NPM	HT	HT
852.	NPM	NPM	HOM	NPM
853.	NPM	NPM	HOM	HT
854.	NPM	NPM	HT	NPM
855.	NPM	HT	HOM	NPM
856.	NPM	NPM	HOM	HT
857.	NPM	NPM	HOM	NPM
858.	NPM	NPM	HT	NPM
859.	NPM	NPM	HOM	NPM
860.	HT	NPM	NPM	NPM
861.	NPM	NPM	HT	NPM
862.	NPM	NPM	HT	HT
863.	NPM	NPM	HOM	NPM
864.	NPM	NPM	HT	HT
865.	NPM	NPM	HT	NPM
866.	NPM	NPM	HT	NPM
867.	NPM	NPM	HT	NPM
868.	NPM	NPM	NPM	HT
869.	NPM	NPM	NPM	NPM
870.	NPM	NPM	HT	NPM
871.	NPM	NPM	HT	*
872.	NPM	NPM	HT	NPM
873.	NPM	NPM	HT	HT
874.	NPM	HT	HT	HT
875.	NPM	NPM	HT	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
876.	NPM	NPM	NPM	NPM
877.	NPM	NPM	HT	NPM
878.	NPM	NPM	HT	NPM
879.	NPM	NPM	NPM	NPM
880.	NPM	NPM	HT	HT
881.	NPM	NPM	HT	NPM
882.	NPM	NPM	NPM	NPM
883.	NPM	NPM	NPM	HT
884.	NPM	NPM	NPM	HT
885.	NPM	NPM	NPM	NPM
886.	NPM	NPM	HT	NPM
887.	NPM	NPM	HT	NPM
888.	NPM	NPM	NPM	NPM
889.	NPM	NPM	HT	NPM
890.	NPM	NPM	HT	NPM
891.	NPM	NPM	HT	NPM
892.	HT	NPM	HT	NPM
893.	NPM	NPM	HOM	NPM
894.	NPM	NPM	HOM	HT
895.	NPM	NPM	HT	NPM
896.	HT	HT	HT	NPM
897.	NPM	NPM	NPM	NPM
898.	NPM	NPM	NPM	NPM
899.	NPM	NPM	NPM	HT
900.	NPM	NPM	HOM	HT
901.	NPM	NPM	NPM	HT
902.	NPM	NPM	NPM	NPM
903.	NPM	NPM	HT	NPM
904.	NPM	NPM	HOM	NPM
905.	NPM	NPM	NPM	NPM
906.	NPM	NPM	NPM	NPM
907.	NPM	NPM	NPM	NPM
908.	NPM	NPM	NPM	NPM
909.	NPM	NPM	HT	NPM
910.	NPM	NPM	NPM	HT

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
911.	NPM	NPM	NPM	NPM
912.	NPM	NPM	HOM	HT
913.	NPM	NPM	HT	HOM
914.	NPM	NPM	HT	NPM
915.	NPM	NPM	HT	NPM
916.	NPM	NPM	HT	NPM
917.	NPM	NPM	HT	NPM
918.	NPM	NPM	HT	NPM
919.	NPM	NPM	NPM	NPM
920.	NPM	NPM	NPM	NPM
921.	NPM	NPM	NPM	NPM
922.	NPM	NPM	HT	HOM
923.	NPM	NPM	HOM	NPM
924.	NPM	NPM	HT	NPM
925.	NPM	NPM	HOM	NPM
926.	NPM	NPM	HOM	NPM
927.	NPM	NPM	HT	NPM
928.	NPM	NPM	NPM	NPM
929.	HT	NPM	NPM	HT
930.	NPM	NPM	HT	NPM
931.	NPM	NPM	NPM	NPM
932.	HT	NPM	HOM	NPM
933.	NPM	NPM	HT	HT
934.	HT	NPM	NPM	NPM
935.	NPM	NPM	HT	NPM
936.	NPM	NPM	NPM	NPM
937.	NPM	NPM	HT	NPM
938.	NPM	NPM	NPM	HT
939.	NPM	NPM	HOM	NPM
940.	NPM	NPM	HOM	NPM
941.	NPM	NPM	HT	NPM
942.	NPM	NPM	HT	NPM
943.	NPM	NPM	HOM	NPM
944.	NPM	NPM	HT	NPM
945.	NPM	NPM	HOM	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
946.	NPM	NPM	HOM	NPM
947.	NPM	NPM	HT	HT
948.	NPM	NPM	HOM	NPM
949.	NPM	NPM	HT	HT
950.	NPM	NPM	HOM	NPM
951.	NPM	NPM	HT	NPM
952.	NPM	NPM	NPM	NPM
953.	NPM	NPM	HOM	NPM
954.	NPM	HT	NPM	HT
955.	NPM	NPM	NPM	NPM
956.	NPM	NPM	HT	HT
957.	NPM	NPM	HT	NPM
958.	NPM	NPM	HT	NPM
959.	NPM	NPM	NPM	HT
960.	NPM	NPM	NPM	NPM
961.	NPM	NPM	HOM	HT
962.	NPM	NPM	NPM	NPM
963.	NPM	NPM	HT	NPM
964.	NPM	NPM	HOM	NPM
965.	NPM	NPM	HT	NPM
966.	NPM	HT	HOM	HT
967.	NPM	NPM	HT	NPM
968.	NPM	NPM	NPM	NPM
969.	NPM	HT	NPM	NPM
970.	NPM	NPM	HT	NPM
971.	NPM	NPM	NPM	HT
972.	NPM	NPM	HT	HT
973.	NPM	NPM	HOM	HT
974.	NPM	NPM	NPM	HOM
975.	NPM	NPM	HOM	NPM
976.	NPM	NPM	HT	NPM
977.	NPM	NPM	HT	NPM
978.	NPM	NPM	HT	NPM
979.	NPM	NPM	NPM	NPM
980.	NPM	HT	HT	HT

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
981.	NPM	NPM	HOM	HT
982.	NPM	NPM	HT	NPM
983.	NPM	NPM	NPM	HT
984.	NPM	NPM	HT	NPM
985.	NPM	NPM	NPM	NPM
986.	NPM	NPM	NPM	NPM
987.	NPM	NPM	NPM	NPM
988.	NPM	NPM	NPM	NPM
989.	NPM	NPM	HT	NPM
990.	NPM	NPM	HT	NPM
991.	NPM	NPM	HT	NPM
992.	NPM	NPM	NPM	NPM
993.	NPM	NPM	NPM	HT
994.	NPM	NPM	HOM	HT
995.	NPM	NPM	HT	NPM
996.	NPM	NPM	HOM	NPM
997.	NPM	NPM	HT	NPM
998.	NPM	NPM	HT	HT
999.	NPM	HT	NPM	NPM
1000.	NPM	NPM	HT	NPM
1001.	NPM	NPM	HOM	NPM
1002.	NPM	NPM	HT	HT
1003.	NPM	NPM	NPM	NPM
1004.	NPM	NPM	NPM	NPM
1005.	NPM	NPM	HT	NPM
1006.	NPM	NPM	HT	NPM
1007.	NPM	NPM	NPM	HT
1008.	NPM	NPM	HT	HT
1009.	NPM	NPM	NPM	NPM
1010.	NPM	NPM	NPM	NPM
1011.	NPM	NPM	NPM	NPM
1012.	NPM	NPM	HT	NPM
1013.	NPM	NPM	NPM	NPM
1014.	NPM	NPM	NPM	NPM
1015.	NPM	NPM	HOM	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1016.	NPM	NPM	NPM	NPM
1017.	NPM	NPM	NPM	NPM
1018.	NPM	NPM	HT	NPM
1019.	NPM	NPM	HT	HT
1020.	NPM	NPM	HT	NPM
1021.	HT	NPM	NPM	NPM
1022.	NPM	NPM	HT	HT
1023.	NPM	NPM	HOM	NPM
1024.	HT	NPM	HOM	NPM
1025.	NPM	NPM	NPM	NPM
1026.	NPM	NPM	HT	NPM
1027.	NPM	NPM	HT	HOM
1028.	NPM	NPM	NPM	HT
1029.	NPM	NPM	HOM	HT
1030.	NPM	NPM	NPM	HT
1031.	NPM	NPM	HOM	HT
1032.	NPM	NPM	HOM	HT
1033.	NPM	NPM	NPM	HT
1034.	NPM	NPM	HOM	NPM
1035.	NPM	NPM	NPM	NPM
1036.	NPM	NPM	HT	HT
1037.	NPM	NPM	NPM	NPM
1038.	NPM	NPM	HT	HT
1039.	NPM	NPM	NPM	NPM
1040.	NPM	NPM	NPM	NPM
1041.	NPM	NPM	NPM	HT
1042.	NPM	NPM	HT	NPM
1043.	NPM	NPM	HT	NPM
1044.	NPM	NPM	HT	NPM
1045.	NPM	NPM	HT	HOM
1046.	NPM	NPM	HOM	NPM
1047.	NPM	NPM	NPM	HT
1048.	NPM	NPM	NPM	NPM
1049.	NPM	NPM	NPM	HT
1050.	NPM	NPM	HOM	HOM

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1051.	NPM	NPM	HT	HT
1052.	NPM	NPM	NPM	NPM
1053.	NPM	NPM	HT	NPM
1054.	NPM	NPM	HOM	HT
1055.	NPM	NPM	HT	NPM
1056.	NPM	NPM	HT	NPM
1057.	NPM	NPM	HT	NPM
1058.	NPM	NPM	HT	HT
1059.	NPM	NPM	HT	NPM
1060.	NPM	NPM	NPM	NPM
1061.	NPM	NPM	NPM	NPM
1062.	NPM	NPM	HT	NPM
1063.	NPM	HT	NPM	NPM
1064.	NPM	NPM	HT	NPM
1065.	NPM	NPM	NPM	NPM
1066.	NPM	NPM	NPM	NPM
1067.	NPM	NPM	HT	HT
1068.	NPM	NPM	HOM	NPM
1069.	NPM	NPM	HT	HT
1070.	NPM	NPM	HOM	NPM
1071.	NPM	NPM	HT	HT
1072.	NPM	HT	NPM	HOM
1073.	NPM	NPM	NPM	HT
1074.	NPM	NPM	HT	NPM
1075.	NPM	NPM	HT	NPM
1076.	NPM	NPM	NPM	NPM
1077.	NPM	NPM	HOM	NPM
1078.	NPM	NPM	HT	NPM
1079.	NPM	NPM	NPM	NPM
1080.	NPM	NPM	HT	NPM
1081.	NPM	NPM	HT	HT
1082.	NPM	NPM	NPM	HT
1083.	NPM	NPM	HT	HT
1084.	NPM	NPM	HT	NPM
1085.	NPM	NPM	NPM	NPM

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1086.	NPM	NPM	HT	NPM
1087.	NPM	NPM	HT	HT
1088.	NPM	NPM	NPM	HT
1089.	NPM	NPM	HT	NPM
1090.	NPM	HT	HOM	NPM
1091.	NPM	NPM	NPM	HT
1092.	NPM	HT	HOM	NPM
1093.	NPM	NPM	NPM	HT
1094.	NPM	NPM	NPM	HT
1095.	NPM	NPM	HT	NPM
1096.	NPM	NPM	HT	NPM
1097.	NPM	NPM	HT	NPM
1098.	NPM	NPM	HT	NPM
1099.	NPM	NPM	HT	NPM
1100.	NPM	NPM	HT	NPM
1101.	NPM	HT	NPM	*
1102.	NPM	NPM	HT	*
1103.	NPM	NPM	HT	*
1104.	NPM	NPM	NPM	*
1105.	NPM	NPM	HT	*
1106.	NPM	NPM	NPM	*
1107.	NPM	NPM	NPM	*
1108.	NPM	NPM	HOM	NPM
1109.	NPM	NPM	NPM	*
1110.	NPM	NPM	NPM	*
1111.	NPM	NPM	HT	*
1112.	NPM	NPM	NPM	*
1113.	NPM	NPM	NPM	*
1114.	NPM	NPM	HT	*
1115.	NPM	NPM	HT	*
1116.	HT	NPM	NPM	*
1117.	NPM	NPM	NPM	*
1118.	NPM	NPM	HOM	*
1119.	NPM	NPM	HT	*
1120.	NPM	NPM	HOM	*

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1121.	NPM	NPM	NPM	*
1122.	NPM	NPM	HT	*
1123.	NPM	NPM	HT	*
1124.	NPM	NPM	NPM	*
1125.	NPM	NPM	HT	*
1126.	NPM	NPM	NPM	*
1127.	NPM	NPM	HT	*
1128.	NPM	HT	HOM	NPM
1129.	NPM	NPM	HOM	HT
1130.	NPM	NPM	NPM	NPM
1131.	NPM	NPM	NPM	HT
1132.	NPM	NPM	HOM	HT
1133.	NPM	NPM	HT	*
1134.	NPM	NPM	HT	*
1135.	NPM	NPM	HT	*
1136.	NPM	NPM	HT	*
1137.	NPM	NPM	HOM	*
1138.	NPM	NPM	NPM	*
1139.	NPM	NPM	HT	*
1140.	NPM	NPM	HT	*
1141.	NPM	NPM	HT	*
1142.	NPM	NPM	NPM	*
1143.	NPM	HT	HOM	*
1144.	NPM	NPM	NPM	*
1145.	NPM	NPM	NPM	*
1146.	NPM	NPM	HOM	*
1147.	NPM	HT	NPM	*
1148.	HT	HT	HT	*
1149.	NPM	HT	HT	*
1150.	HT	HT	NPM	*
1151.	HT	NPM	NPM	*
1152.	NPM	NPM	HT	*
1153.	NPM	NPM	HT	*
1154.	NPM	NPM	HT	*
1155.	NPM	NPM	HT	*

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1156.	NPM	NPM	HT	*
1157.	NPM	NPM	HT	*
1158.	NPM	NPM	NPM	*
1159.	NPM	NPM	NPM	*
1160.	NPM	NPM	NPM	*
1161.	NPM	NPM	HT	*
1162.	NPM	NPM	HOM	HOM
1163.	NPM	NPM	NPM	*
1164.	NPM	HT	HT	HOM
1165.	NPM	NPM	HOM	*
1166.	NPM	NPM	HT	*
1167.	NPM	NPM	HT	*
1168.	NPM	NPM	NPM	*
1169.	NPM	NPM	HT	*
1170.	NPM	NPM	HT	*
1171.	NPM	HT	HOM	*
1172.	NPM	NPM	HOM	*
1173.	NPM	NPM	NPM	*
1174.	NPM	NPM	HOM	*
1175.	NPM	NPM	NPM	*
1176.	NPM	NPM	NPM	*
1177.	NPM	NPM	HOM	*
1178.	NPM	NPM	HOM	*
1179.	NPM	HT	HT	*
1180.	NPM	NPM	NPM	*
1181.	NPM	NPM	NPM	*
1182.	NPM	NPM	HT	*
1183.	NPM	NPM	HT	*
1184.	NPM	NPM	HT	*
1185.	NPM	NPM	NPM	*
1186.	NPM	NPM	HOM	*
1187.	HT	NPM	HT	*
1188.	NPM	NPM	HT	*
1189.	NPM	NPM	NPM	*
1190.	NPM	NPM	HT	*

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1191.	NPM	NPM	HT	*
1192.	NPM	NPM	HT	*
1193.	NPM	NPM	HOM	*
1194.	NPM	HT	HT	*
1195.	NPM	HT	HOM	*
1196.	NPM	NPM	NPM	*
1197.	NPM	NPM	HT	HOM
1198.	NPM	NPM	NPM	*
1199.	NPM	NPM	HOM	HOM
1200.	NPM	NPM	HT	*
1201.	HT	NPM	HT	*
1202.	NPM	NPM	HT	*
1203.	NPM	NPM	HOM	*
1204.	NPM	NPM	NPM	*
1205.	NPM	NPM	NPM	*
1206.	NPM	NPM	NPM	*
1207.	NPM	NPM	HT	*
1208.	NPM	HT	HOM	*
1209.	NPM	NPM	NPM	*
1210.	NPM	NPM	HT	*
1211.	NPM	NPM	HOM	*
1212.	NPM	HT	HT	*
1213.	NPM	NPM	NPM	*
1214.	NPM	NPM	HT	*
1215.	NPM	NPM	HT	HOM
1216.	NPM	NPM	HOM	*
1217.	NPM	NPM	NPM	*
1218.	NPM	NPM	NPM	*
1219.	NPM	NPM	HOM	*
1220.	NPM	NPM	HT	*
1221.	NPM	NPM	NPM	*
1222.	NPM	NPM	NPM	*
1223.	NPM	NPM	HT	*
1224.	NPM	NPM	NPM	*
1225.	NPM	NPM	HOM	*

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1226.	NPM	NPM	HT	*
1227.	NPM	NPM	HOM	*
1228.	NPM	NPM	HT	*
1229.	NPM	HT	HT	*
1230.	NPM	NPM	HT	*
1231.	NPM	NPM	NPM	*
1232.	NPM	NPM	HOM	*
1233.	NPM	NPM	HT	*
1234.	NPM	NPM	NPM	*
1235.	NPM	NPM	HT	*
1236.	NPM	NPM	HOM	*
1237.	NPM	NPM	HOM	*
1238.	HT	NPM	HOM	*
1239.	NPM	NPM	HT	*
1240.	NPM	NPM	HT	*
1241.	NPM	NPM	HOM	*
1242.	NPM	NPM	HT	*
1243.	NPM	NPM	NPM	*
1244.	NPM	NPM	NPM	*
1245.	NPM	NPM	HOM	*
1246.	NPM	HT	NPM	*
1247.	HT	NPM	HOM	*
1248.	NPM	NPM	HT	*
1249.	NPM	NPM	HOM	*
1250.	NPM	NPM	HOM	*
1251.	NPM	NPM	HOM	*
1252.	NPM	NPM	NPM	*
1253.	NPM	NPM	HT	*
1254.	NPM	HT	HT	*
1255.	NPM	NPM	HT	*
1256.	NPM	NPM	HT	*
1257.	NPM	NPM	HT	*
1258.	NPM	NPM	HT	*
1259.	NPM	NPM	HT	*
1260.	HT	NPM	NPM	*

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1261.	HT	HT	HT	*
1262.	NPM	HT	HT	*
1263.	HT	HT	NPM	*
1264.	NPM	NPM	NPM	*
1265.	NPM	NPM	HT	*
1266.	NPM	NPM	HT	*
1267.	NPM	NPM	HT	*
1268.	HT	NPM	HT	*
1269.	NPM	NPM	NPM	*
1270.	NPM	NPM	NPM	*
1271.	NPM	HT	HT	*
1272.	NPM	HT	HT	*
1273.	NPM	NPM	NPM	*
1274.	NPM	NPM	HT	*
1275.	NPM	NPM	NPM	*
1276.	NPM	NPM	HOM	*
1277.	NPM	NPM	NPM	*
1278.	NPM	NPM	NPM	*
1279.	NPM	NPM	NPM	*
1280.	NPM	NPM	NPM	*
1281.	NPM	NPM	HT	*
1282.	NPM	NPM	HOM	*
1283.	NPM	NPM	HT	*
1284.	NPM	NPM	HT	*
1285.	NPM	NPM	HOM	*
1286.	NPM	NPM	NPM	*
1287.	NPM	NPM	HT	*
1288.	HT	NPM	NPM	*
1289.	NPM	NPM	NPM	*
1290.	NPM	NPM	HT	*
1291.	NPM	NPM	HT	*
1292.	NPM	NPM	HT	*
1293.	NPM	NPM	HT	*
1294.	NPM	NPM	HT	*
1295.	NPM	NPM	HT	*

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1296.	NPM	NPM	HT	*
1297.	NPM	NPM	HT	*
1298.	NPM	NPM	HT	*
1299.	NPM	NPM	NPM	*
1300.	NPM	NPM	HT	*
1301.	NPM	NPM	HT	*
1302.	NPM	HT	HT	*
1303.	NPM	HT	HT	*
1304.	NPM	NPM	HT	*
1305.	NPM	HT	NPM	*
1306.	NPM	NPM	HT	*
1307.	NPM	NPM	NPM	*
1308.	NPM	NPM	NPM	*
1309.	NPM	NPM	NPM	*
1310.	NPM	NPM	NPM	*
1311.	HT	HT	NPM	*
1312.	NPM	NPM	NPM	*
1313.	NPM	NPM	HT	*
1314.	NPM	NPM	HT	*
1315.	NPM	NPM	NPM	*
1316.	NPM	NPM	HT	*
1317.	NPM	NPM	HT	*
1318.	NPM	NPM	NPM	*
1319.	NPM	NPM	HT	*
1320.	NPM	NPM	HT	*
1321.	NPM	HT	NPM	*
1322.	NPM	NPM	HT	*
1323.	NPM	NPM	NPM	*
1324.	NPM	NPM	NPM	*
1325.	NPM	NPM	HT	*
1326.	NPM	NPM	HT	*
1327.	NPM	NPM	HOM	*
1328.	NPM	NPM	HT	*
1329.	NPM	NPM	HT	*
1330.	NPM	NPM	HOM	*

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1331.	NPM	NPM	NPM	*
1332.	NPM	NPM	HOM	*
1333.	NPM	NPM	HT	*
1334.	NPM	NPM	NPM	*
1335.	HT	NPM	HT	*
1336.	NPM	NPM	NPM	*
1337.	NPM	NPM	NPM	*
1338.	NPM	NPM	HT	*
1339.	NPM	HT	HT	*
1340.	NPM	HT	HOM	*
1341.	NPM	NPM	HOM	*
1342.	HT	NPM	HT	*
1343.	NPM	NPM	NPM	*
1344.	NPM	NPM	HT	*
1345.	NPM	NPM	HT	*
1346.	NPM	NPM	HT	*
1347.	NPM	NPM	HT	*
1348.	NPM	NPM	NPM	*
1349.	HT	HT	HT	*
1350.	HT	NPM	HT	*
1351.	NPM	NPM	HT	*
1352.	NPM	NPM	HT	*
1353.	NPM	NPM	HT	*
1354.	NPM	NPM	NPM	*
1355.	NPM	NPM	NPM	*
1356.	NPM	NPM	NPM	*
1357.	NPM	NPM	HT	*
1358.	NPM	NPM	HT	*
1359.	NPM	HT	HT	*
1360.	NPM	NPM	HT	*
1361.	NPM	NPM	HT	*
1362.	NPM	NPM	HOM	*
1363.	NPM	NPM	HT	*
1364.	NPM	NPM	NPM	*
1365.	NPM	NPM	HT	*

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1366.	NPM	NPM	HT	*
1367.	NPM	HT	NPM	*
1368.	NPM	NPM	HOM	*
1369.	NPM	NPM	HT	*
1370.	NPM	NPM	NPM	*
1371.	NPM	NPM	NPM	*
1372.	NPM	NPM	HOM	*
1373.	NPM	NPM	NPM	*
1374.	NPM	NPM	HOM	*
1375.	NPM	NPM	NPM	*
1376.	NPM	NPM	HT	*
1377.	NPM	NPM	NPM	*
1378.	NPM	HT	NPM	*
1379.	NPM	NPM	NPM	*
1380.	NPM	NPM	NPM	*
1381.	NPM	NPM	HT	*
1382.	NPM	NPM	NPM	*
1383.	NPM	NPM	HT	*
1384.	NPM	NPM	HOM	*
1385.	NPM	NPM	NPM	*
1386.	NPM	NPM	HOM	*
1387.	NPM	NPM	NPM	*
1388.	NPM	NPM	HT	*
1389.	HT	NPM	NPM	*
1390.	NPM	NPM	NPM	*
1391.	NPM	HT	NPM	*
1392.	NPM	NPM	NPM	*
1393.	NPM	NPM	HOM	*
1394.	HT	HT	HT	*
1395.	NPM	NPM	NPM	*
1396.	NPM	NPM	HOM	*
1397.	NPM	NPM	NPM	*
1398.	NPM	HT	HT	*
1399.	NPM	NPM	HT	*
1400.	NPM	NPM	HT	*

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1401.	NPM	NPM	HOM	*
1402.	NPM	NPM	HT	*
1403.	NPM	NPM	NPM	*
1404.	NPM	NPM	NPM	*
1405.	NPM	NPM	HT	*
1406.	HT	NPM	HT	*
1407.	NPM	NPM	HT	*
1408.	NPM	NPM	NPM	*
1409.	NPM	NPM	HT	*
1410.	NPM	NPM	NPM	*
1411.	NPM	NPM	HT	*
1412.	HT	NPM	NPM	*
1413.	NPM	NPM	HT	*
1414.	NPM	NPM	NPM	*
1415.	NPM	HT	HOM	*
1416.	NPM	NPM	HT	*
1417.	NPM	NPM	NPM	*
1418.	NPM	NPM	NPM	*
1419.	NPM	NPM	HT	*
1420.	NPM	NPM	HT	*
1421.	NPM	NPM	NPM	*
1422.	NPM	NPM	HT	*
1423.	NPM	NPM	HOM	*
1424.	NPM	NPM	NPM	*
1425.	NPM	NPM	HT	*
1426.	NPM	NPM	HOM	*
1427.	NPM	NPM	HOM	*
1428.	NPM	NPM	HT	*
1429.	NPM	NPM	HOM	*
1430.	NPM	NPM	HT	*
1431.	NPM	HT	HT	*
1432.	NPM	NPM	NPM	*
1433.	NPM	NPM	HOM	*
1434.	NPM	NPM	HT	*
1435.	NPM	NPM	NPM	*

Nº	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1436.	NPM	NPM	HT	*
1437.	NPM	NPM	HOM	*
1438.	NPM	NPM	NPM	*
1439.	NPM	NPM	NPM	*
1440.	NPM	NPM	HOM	*
1441.	NPM	HT	NPM	*
1442.	NPM	NPM	NPM	*
1443.	NPM	NPM	NPM	*
1444.	NPM	NPM	HT	*
1445.	NPM	NPM	NPM	*
1446.	NPM	NPM	HT	*
1447.	NPM	NPM	HOM	*
1448.	NPM	NPM	HT	*
1449.	HT	NPM	HT	*
1450.	NPM	NPM	HT	*
1451.	NPM	NPM	NPM	*
1452.	NPM	NPM	NPM	*
1453.	NPM	NPM	HT	*
1454.	NPM	NPM	HT	*
1455.	NPM	NPM	HT	*
1456.	HT	NPM	NPM	*
1457.	NPM	NPM	HT	*
1458.	NPM	NPM	HOM	*
1459.	NPM	NPM	NPM	*
1460.	NPM	NPM	HT	*
1461.	NPM	NPM	NPM	*
1462.	NPM	NPM	NPM	*
1463.	NPM	NPM	NPM	*
1464.	NPM	NPM	HT	*
1465.	NPM	NPM	HT	*
1466.	NPM	NPM	HOM	*
1467.	NPM	NPM	HT	*
1468.	NPM	NPM	HT	*
1469.	NPM	NPM	HT	*
1470.	NPM	HT	HT	*

N°	Protrombina	Factor V	MTHFR	Factor XII
1471.	NPM	NPM	HOM	*
1472.	NPM	NPM	NPM	*
1473.	NPM	NPM	HT	*
1474.	NPM	NPM	HT	*
1475.	NPM	NPM	NPM	*
1476.	NPM	NPM	NPM	*
1477.	NPM	NPM	HT	*
1478.	NPM	NPM	HT	*
1479.	NPM	NPM	NPM	*
1480.	NPM	NPM	HT	*
1481.	NPM	NPM	NPM	*
1482.	NPM	NPM	NPM	*
1483.	NPM	NPM	NPM	*
1484.	NPM	NPM	NPM	*
1485.	NPM	NPM	HOM	*
1486.	NPM	NPM	HT	*
1487.	NPM	NPM	NPM	*
1488.	NPM	HT	HT	*
1489.	NPM	NPM	NPM	*
1490.	NPM	NPM	HT	*
1491.	NPM	NPM	HT	*
1492.	NPM	HT	HT	*
1493.	NPM	NPM	HT	*
1494.	NPM	NPM	HT	*
1495.	NPM	NPM	HT	*
1496.	NPM	NPM	HT	*
1497.	NPM	NPM	NPM	*
1498.	NPM	NPM	NPM	*
1499.	NPM	NPM	HT	*

*: No realizado.

HT: Heterocigoto.

HOM: Homocigoto.

NPM: No presenta mutación.

Media de los 21 parámetros del “Estudio de Trombofilias” en los 931 pacientes.

Parámetro de laboratorio	Media
Actividad Protrombina (70-130)	109.32
Tiempo Trombina (13-22)	14.58
INR (0.8-1.2)	0.98
Fibrinógeno (180-400)	329.66
Dímero D (0-234)	150.73
Factor VIII (50-120)	131.02
APTT (22-32)	31.68
AT III funcional (80-120)	105.37
Proteína C funcional (50-130)	111.29
Proteína S funcional (50-130)	102.76
VV Russel diluido (0-1.2)	1.07
Resistencia Proteína C (> 2.04)	2.93
Homocisteína (5-15)	11.84
TTPA-SP (22-32)	28.79
Plasminógeno (76-126)	99.93
Ac. Anticardiolipina IgM (0-12)	2.75
Ac. Anticardiolipina IgG (0-12)	4.27
Ac. β 2 Glucoproteína 1 IgM (0-12)	1.71
Ac. β 2 Glucoproteína 1 IgG (0-12)	1.96
α 2 Antiplasmina	110.29

