

Factor V Leiden y mutación de la protrombina G20210A en pacientes con trombosis venosa y arterial

Iván Palomo G^{1a}, Jaime Pereira G², Marcelo Alarcón L^{1a}, Carmen Pinochet P³, María T Vélez SM^{4a}, Patricia Hidalgo P^{2a}, Karin Skagerberg¹, Fernando Poblete C^{5b}.

Factor V Leiden and prothrombin G20210A among Chilean patients with venous and arterial thrombosis

Background: Factor V Leiden and G20210A mutation of prothrombin gene are two important genetic polymorphisms associated with an increased risk for thrombosis. **Aim:** To establish the prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutation in the Chilean population and their association to venous and arterial thromboembolism. **Material and methods:** A case-control study was conducted where 149 patients with thrombosis (87 with arterial and 62 with venous thrombosis) confirmed by CAT-scan, electrocardiogram and cardiac enzymes or Doppler depending on the case, and 160 healthy blood donors were genetically analyzed for the presence of both polymorphisms. **Results:** Factor V Leiden mutation was found in 5.4% of patients and in 1.3% of healthy controls ($p=0.04$). Heterozygosity for G20210A prothrombin mutation was found in 5.4% of patients and in 2.5% of the control group ($p=NS$). When arterial and venous thrombosis were considered as separate entities, 4.6% of patients with arterial thrombosis and 6.5% with venous thrombosis presented factor V Leiden ($p=NS$). Likewise, 8.1% of patients with venous thrombosis and 3.5% of patients with arterial thrombosis had G20210A prothrombin mutation ($p=NS$). **Conclusions:** In non selected consecutive Chilean patients with arterial and venous thrombosis the frequency of factor V Leiden and prothrombin G20210A is less than we could expect from their prevalence in the general population (Rev Méd Chile 2005; 133: 1425-33).

(Key Words: Factor V, deficiency; Prothrombin; Thromboembolism; Venous thrombosis)

Recibido el 24 de enero, 2005. Aceptado el 30 de junio, 2005.

¹Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunohematología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca.

²Departamento de Hematología-Oncología, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

³Servicio de Medicina Hospital Regional de Talca y Escuela de Medicina, Universidad San Sebastián.

⁴Laboratorio Central, Hospital Regional de Talca.

⁵Departamento de Biotecnología, Universidad de Talca.

^aTecnólogo Médico

^bBioquímico

Correspondencia a: Iván Palomo, PhD. Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunohematología, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Talca, Talca, Chile. Casilla 747, Talca, Chile. Fono-Fax: 56-71-200488. E-mail: ipalomo@utalca.cl

La trombosis es una enfermedad multifactorial en la que participan tanto factores adquiridos como genéticos^{1,2}. En relación a estos últimos, dos polimorfismos han sido implicados con mayor frecuencia, el factor V Leiden y la mutación del gen de la protrombina (PT) G20210A^{3,4}.

En 1993, Dahlbäck et al⁵ describieron la resistencia a la acción de la proteína C activada (RPCA), la cual es causada por una sustitución nucleotídica, G por A en posición 1691 (G1691A) en el gen del factor V (FV) humano, lo que se traduce en un reemplazo a nivel aminoacídico de Arg por Gln en posición 506, que produce un FV resistente a la inactivación por la PCA⁶. El FV Leiden está presente en 20-50% de los pacientes que desarrollan trombosis venosa⁶⁻⁸ y su frecuencia se encuentra en alrededor de 5% de individuos normales caucásicos, y en menor frecuencia en minorías étnicas de Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU.) y en la población de Asia, África y América Latina^{7,9-12}. En los portadores heterocigotos del FV Leiden, el riesgo de sufrir un evento trombótico aumenta 3-7 veces^{4,7,10} y en los homocigotos 80 veces⁴. En trombosis arteriales, el FV Leiden tiene poca importancia, al menos en pacientes no seleccionados^{8,13}, aunque la mutación podría tener importancia en mujeres jóvenes y pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) con angiografía coronaria negativa^{1,8}.

El segundo polimorfismo es una variación genética de la región 3' no codificante del gen de la PT; corresponde a una sustitución de G por A en la posición 20210 (G20210A). Esta mutación se asocia a un aumento del nivel plasmático de la PT, especialmente en los homocigotos (A/A)^{14,15}. La elevación plasmática de la protrombina se asocia con la inhibición de la proteína S, cofactor de la PCA¹⁶; también disminuye la actividad anticoagulante no dependiente de la PCA lo que aumenta el riesgo de trombosis¹⁷. Este polimorfismo se asocia con un incremento de 3 veces el riesgo de sufrir un evento trombótico venoso en heterocigotos (G/A), comparado con individuos normales homocigotos (G/G)¹⁸⁻²². La importancia de la mutación PT G20210A en la trombosis arterial aún no está suficientemente clara⁸; algunos estudios sugieren que podría ser un riesgo de IAM en fumadores jóvenes^{23,24}. La prevalencia de este polimorfismo ha sido estudiado en varias poblaciones siendo más común en el sur (2,3%-6,5%) que el norte (1,2%-2,6%) de Europa, y es muy

rara en Asia e individuos de ascendencia asiática^{18,25-29}. En un grupo de Groenlandia no se encontró la mutación³⁰. El propósito de este estudio fue determinar la prevalencia de ambos polimorfismos en pacientes no seleccionados con trombosis arterial y venosa.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes. Estudiamos 149 pacientes con trombosis diagnosticada en el Hospital Regional de Talca. El promedio de edad fue de 57±17 años; 47,6% fueron hombres y 52,4% mujeres (Tabla 1). Ochenta y siete (58,4%) pacientes presentaron trombosis arterial (accidente vascular encefálico (AVE)=36,3% e IAM=22,2%), y 62 (41,6%) presentaron trombosis venosa profunda (TVP).

La trombosis venosa fue confirmada por venografía y Doppler y en los casos de trombosis arterial por tomografía axial computarizada (TAC), electrocardiograma, enzimas cardíacas y Doppler, según cada caso. Para obtener información sobre eventos trombóticos previos y conocer los factores de riesgo clásicos de trombosis de los pacientes, se utilizó un cuestionario estandarizado. De los 36 pacientes que presentaban historia de trombosis, 35,7% era venosa y 64,3% arterial; de ellos 2 pacientes tenían FV Leiden y ninguno presentó mutación de la PT G20210A. La información sobre factores de riesgo de trombosis se obtuvo en 127 pacientes. El factor de riesgo más frecuente para trombosis arterial fue la hipertensión (59,1%), seguido de tabaquismo (39,3%), obesidad (24,6%), dislipidemia (22,9%) y diabetes (21,3%). Cáncer fue el factor de riesgo más frecuente para trombosis venosa (8,9%). La edad (>55 años), un factor de riesgo tanto para trombosis arterial como venosa, estuvo presente en 62,1% de los pacientes. El 25,7% de los pacientes presentó algún evento trombótico previo y sólo uno tenía familia con historia de trombosis.

El grupo control estuvo formado por 160 donantes sanos de sangre. Una muestra de 4 ml de sangre fue recolectada de cada paciente y control, la que fue anticoagulada con 1 ml de EDTA (1 mg/ml).

Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Talca y cada paciente firmó un consentimiento informado.

Tabla 1. Tipos de trombosis y factores de riesgo clásicos en los pacientes estudiados

n	149		
Edad	57±17		
Sexo	Mujeres	52,4%	
	Hombres	47,6%	
Tipo de trombosis		Mujeres	Hombres
Trombosis venosa profunda	62 (41,6%)	40	22
Infarto agudo de miocardio	33 (22,2%)	12	21
Accidente vascular encefálico	54 (36,3%)	26	28
Factores de riesgo			
Trombosis arterial (n: 61)			
Hipertensión	36 (59,1%)		
Obesidad	15 (24,6%)		
Tabaquismo	24 (39,3%)		
Dislipidemias	14 (22,9%)		
Diabetes	13 (21,3%)		
Trombosis venosa (n: 45)			
Enfermedad neoplásica	4 (8,9%)		
Embarazo	0 (0%)		
Anticonceptivos oral	0 (0%)		
Terapia de reemplazo hormonal	0 (0%)		
Cirugía reciente	0 (0%)		
Ambas trombosis (n: 140)			
Edad >55 años	87 (62,1%)		
Trombosis previas	36 (25,7%)		
Historial de trombosis familiar	1 (0,7%)		

Análisis genético de la mutación G1691A (detección del FV Leiden). El ADN se extrajo de leucocitos de sangre periférica usando un procedimiento de extracción estándar, no enzimático³¹. La amplificación y digestión del ADN se realizó de acuerdo a lo descrito previamente^{6,32}. Brevemente, para la PCR RFLP (*Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism*), la reacción en cadena de la polimerasa, se realizó en un volumen final de 25 µL, conteniendo: amortiguador de reacción (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl), 10 mM MgCl₂, 400 µM de cada dNTP, 0,4 µM de partidores (*primer 1: 5'-TGCCAGTGCTTAACAAGACCA-3'* y *primer 2: 5'-TGTTATCACTGGT-GCTAA-3'*) 100 a 500 ng de ADN genómico, y 5 U de Taq polimerasa (*Invitrogen Life Technologies*). La amplificación se realizó en un termociclador (*PTC-100 thermocycler, Mj. Research Inc.*): la de-

naturación inicial fue a 94°C por 5 min seguido de 39 ciclos a 94°C por 20 s, 62°C por 15 s, 72°C por 40 s y la extensión final a 72°C por 10 min. Para la digestión se utilizó la enzima de restricción Mnl1 (*New England Biolabs, Beverly, MA*). El producto digerido de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio (Figura 1).

Análisis genético de la mutación de la protrombina G20210A. Se utilizó PCR anidado (Nested PCR); el método reportado por Poort et al³³ detecta la mutación usando un PCR alelo específico, sin la necesidad de digestión con una enzima de restricción. Se utilizan dos partidores externos (1 *forward: 5'-TCCGCCTGAAGAAGTGGATA-3'* y 2 *backward: 5'-GAGTGCTCGGACTACCAGCGT-GC-3'*) y dos partidores internos *forward (nested)*

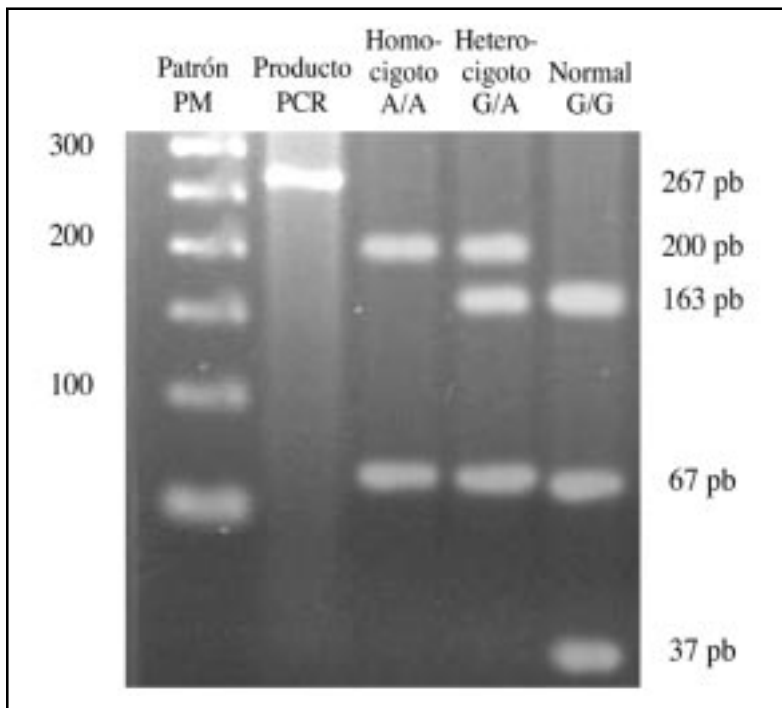


Figura 1. Producto de amplificación de la PCR de pacientes con FV Leiden y controles. Una banda de 267 pb resulta de la amplificación del PCR. Los productos de la enzima de restricción consisten en 3 fragmentos de 163, 67 y 37 pb en individuos normales. En presencia del FV Leiden un corte se pierde y solo 2 fragmentos de 200 y 67 pb son observados.

(3 *forward*: 5'-TTCCCAATAAAAAGTGACTCTCAGCA-3' y 4 *forward*: 5'-TTCCCAATAAAAAGTGACTCTCAGCG-3'). Los dos partidores internos 3 y 4 difieren en el último nucleótido, por ejemplo 20210 G o A. El fragmento de ADN de 270 pb producido por los partidores externos 1 y 2 sirven como un templado para los partidores 3 ó 4 y un control interno de la reacción de PCR. Al usar los partidores 3 ó 4 generan un fragmento de 148 pb. Brevemente, el producto de PCR fue generado por un termociclador (*PTC-100 thermocycler Mj Research Inc.*). Como volumen final de reacción se utilizó 25 μ L: 0,52 μ M de cada *primer*; 400 μ M de cada dNTP, 5 U de Taq polimerasa (Fisher Biotech, Pittsburgh, PA), 7 mM de $MgCl_2$ y amortiguador de reacción (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl). La mezcla se sometió a 33 ciclos con una denaturación inicial a 95°C por 1 min con un *annealing* a 62°C por 1 min y una etapa de

extensión a 67°C por 2 min. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (Figura 2).

Estadística. Las diferencias estadísticas entre pacientes y controles se determinó mediante fórmula de chi-cuadrado para variables categóricas y test t para variables continuas. El *odds ratio* (OR) y 95% de intervalo de confianza (ICs) fue estimado para cada uno de los dos polimorfismos estudiados. Para estimar el efecto de varios factores de riesgo sobre la aparición de trombosis, se utilizó un modelo de regresión lineal que incluyó edad, tabaquismo, hipertensión arterial, hipercolesterolemia o diabetes. Combinaciones de los polimorfismos con tabaquismo y factores de riesgo metabólicos fueron incluidos para la regresión logística y ajustado para la OR con 95% ICs. El nivel de significancia fue de 5% (0,05).

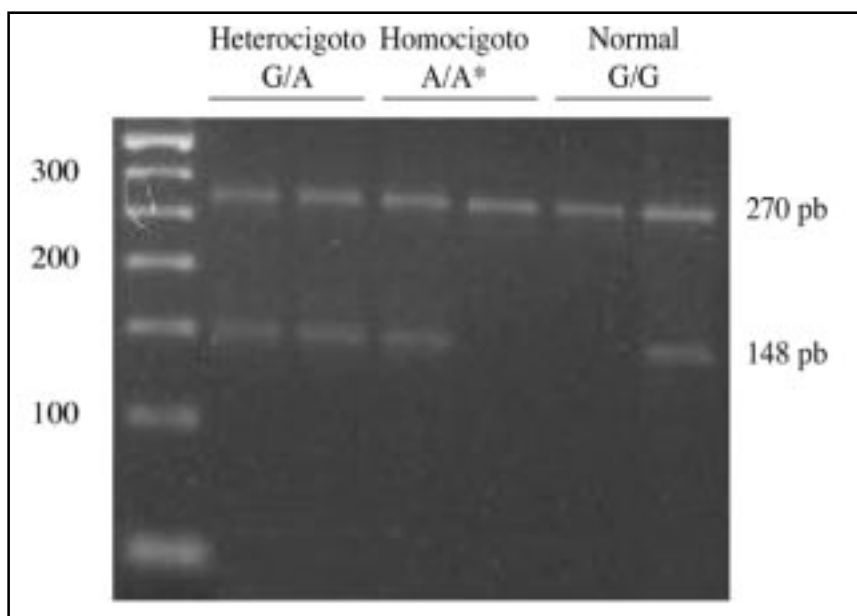


Figura 2. NESTED PCR usado para la detección de la mutación en el gen de la PT G20210A. Se observa una banda de 270 pb, la cual corresponde al fragmento de ADN producido por los partidores externos. El uso del *primer* 3 de la mutación en presencia y del *primer* 4 en ausencia de la misma producen un fragmento de 148 pb. *Control.

RESULTADOS

Prevalencia de los polimorfismos protrombóticos. La prevalencia del FV G1691A fue de 5,4% en los pacientes y 1,3% en el grupo control (OR=4,2, 1,0-29,3; p:0,04). La prevalencia de la mutación PT G20210A fue 5,4% y 2,5% en los pacientes y grupo control, respectivamente (OR=2,0; 0,6-8,9; p: NS)

(Tabla 2). Tanto en los pacientes como en el grupo control no se encontró individuos homocigotos para el FV Leiden o la mutación de la PT G20210A. Asumiendo el equilibrio de Hardy-Weinberg, la frecuencia alélica predictiva para los pacientes heterocigotos fue de 6,0 para ambas mutaciones. En la Tabla 3 se resume la frecuencia alélica y genotípica del FV Leiden y la mutación

Tabla 2. Prevalencia del factor V Leiden y mutación de la protrombina G20210A en pacientes con trombosis y controles

Polimorfismo	Pacientes (n:149)		Grupo control		Odds ratio (n:160)	p
	n	%	n	%		
Factor V Leiden	8	5,4	2	1,3	4,2 (1,0-29,3)	0,04
Protrombina G20210A	8	5,4	4	2,5	2,0 (0,6-8,9)	NS
Factor V Leiden + Protrombina G20210A	3	2,1	0			

Tabla 3. Distribución del genotipo y frecuencia alélica en el factor V Leiden y protrombina G20210A en pacientes con trombosis y controles sanos

	n	Frecuencia alélica				Genotipo					
		FV Leiden (G1691A)		Protrombina G20210A		FV Leiden (G1691A)			Protrombina G20210A		
		G	A	G	A	G/G	G/A	A/A	G/G	G/A	A/A
Pacientes	149	0,97	0,03	0,97	0,03	141 (94,6)	8 (5,4)	0	141 (94,6)	8 (5,4)	0
Controles Sanos	160	0,99	0,01	0,99	0,01	158 (98,8)	2 (1,2)	0	156 (97,5)	4 (2,5)	0

(), porcentaje.

de la PT G20210A en pacientes con trombosis y el grupo control. De los ocho pacientes que presentaban FV Leiden, 2 de ellos eran mujeres jóvenes y otros 2 presentaban asociado IAM. El 15,7% de los pacientes eran fumadores jóvenes de los cuales ninguno presentó algún polimorfismo.

Encontramos que 13/149 (8,7%) de los pacientes presentaron el polimorfismo para el FV G1691A, la mutación de la PT G20210A o ambos. En 10/136 (6,8%) de los casos se encontró solo un polimorfismo: (a) 5 pacientes solo FV Leiden, de ellos 3 casos presentaban TVP y 2 AVE, (b) 5 pacientes sólo la mutación de la PT G20210A, de ellos 4 presentaban TVP y 1 AVE, y (c) 4 pacientes ambos polimorfismos, de ellos 3 casos presentaban IAM y 1 presentó TVP (Tabla 4). En el grupo control 26/160 (1,3%) fueron positivos para el FV Leiden y 4/160 (2,5%) para la mutación de la PT G20210A.

En el grupo con trombosis venosa, se encontró que 4/62 (6,5%) pacientes presentaron FV Leiden y 5/62 (8,1%) para la mutación de la PT G20210A (p: NS). De los 87 pacientes con trombosis arterial 4 (4,6%) presentaron FV Leiden y 3 (3,5%) la mutación de la PT G20210A (p: NS).

Se observó que 2/36 (5,5%) de los pacientes tenía historia de trombosis. Se encontró que 4/127 (3,2%) de los pacientes con al menos un factor de riesgo clásico presentaban FV Leiden; tres de éstos tenían algún factor de riesgo para trombosis arterial (un paciente presentaba HTA, obesidad, tabaquismo, dislipidemia y los otros dos sólo dislipidemia) y un paciente presentó cáncer como factor de riesgo de trombosis venosa. El promedio de edad de dichos pacientes fue 51,8±21,6 años. Por otra parte 4/127 (3,2%) de los pacientes con al menos un factor de riesgo clásico presentaron la mutación de la PT G20210A, en todos los casos

Tabla 4. Prevalencia del factor V Leiden y protrombina G20210A en pacientes con trombosis (n: 149)

	n	%
Un polimorfismo		
Factor V Leiden ^a	5	3,4
Protrombina G20210A ^b	5	3,4
Dos polimorfismos		
Factor V Leiden + protrombina G20210A ^c	3	2,1

a) Trombosis venosa profunda (TVP) (n: 3), Accidente vascular encefálico (AVE) (n: 2).

b) TVP (n: 4), AVE (n: 1).

c) Infarto agudo de miocardio (IAM) (n: 3), TVP (n: 1).

eran factores de riesgo de trombosis arterial (dos pacientes presentaban HTA y los otros dos displipidemia). La edad promedio de estos pacientes fue $56 \pm 17,9$ años.

DISCUSIÓN

Existen varias alteraciones hereditarias en que se ha demostrado una clara asociación en el aumento del riesgo de presentar trombosis tales como la deficiencia de antitrombina III, de proteína C y de proteína S, entre otras³⁴. Sin embargo, los factores de riesgo hereditario como el FV Leiden y la mutación de la PT G20210A son los más frecuentemente asociados con trombosis^{11,12,35,36}. El objetivo de este estudio fue investigar la prevalencia de estos polimorfismos en pacientes chilenos con trombosis arterial y venosa.

Estudios previos muestran que la prevalencia del FV Leiden es de alrededor de 5% en caucásicos y mucho menor en otros grupos étnicos^{7,9-12}. En Argentina, la frecuencia de individuos sanos es de 1,6-3%³⁷.

La mutación de la PT G20210A es más común en el sur que en el norte de Europa y es muy rara en Asia e individuos con ascendencia asiática^{25-29,38}. De acuerdo a un estudio desarrollado en la región de Cataluña, la población española presenta una alta prevalencia de esta mutación (6,5%)¹⁸. En Argentina, la mutación se presenta en 2% de los individuos sanos y en 7,2% de los pacientes con trombosis venosa³⁷.

Nuestros hallazgos, aun cuando el número de individuos normales fue limitado, sugieren que la prevalencia de FV Leiden y de la mutación de la PT G20210A es de aproximadamente 1,3% y 2,5%, respectivamente, en la población no indígena en Chile.

Nosotros encontramos que 5,4% de los pacientes, tanto para la trombosis venosa como arterial,

y 1,3% de los individuos sanos fueron heterocigotos para el FV Leiden, lo que indica un incremento de 4 veces el riesgo de sufrir un episodio de trombosis al ser portador de la mutación del FV Leiden. Este resultado es similar a otros estudios realizados en pacientes con trombosis venosa^{4,7,10}. Nosotros no encontramos relación entre la presencia de la mutación PT G20210A y el incremento en el riesgo de trombosis. La mutación por sí sola podría no ser la causa de eventos trombóticos; actualmente se acepta que la trombosis es de causa multifactorial³⁹, en la que intervienen tanto factores genéticos como adquiridos. Al estudiar separadamente las trombosis arterial y venosa no pudimos establecer una relación entre el FV Leiden y pacientes con trombosis.

La literatura muestra relación entre el FV Leiden y la mutación de la PT G20210A, y el tromboembolismo venoso^{1,3,4,6-8,40} pero la importancia en el desarrollo de la trombosis arterial aún no está lo suficientemente clara⁸.

Existen varias posibles explicaciones para nuestros hallazgos: (a) el número de pacientes es pequeño, (b) los pacientes fueron no seleccionados y consecutivos y (c) con alta prevalencia de otros factores de riesgos conocidos. Las trombofilias hereditarias, especialmente aquellas asociadas a déficit de proteínas anticoagulantes naturales, se concentran en pacientes que presentan eventos trombóticos con ciertas características como la aparición temprana del primer episodio de trombosis (<45 años), trombosis repetidas, historia familiar de trombosis, localización inusual de trombosis o desproporcionada severidad de la trombosis⁴¹.

De acuerdo con nuestros resultados, pareciera poco justificado el estudio de factores de riesgo hereditarios en pacientes no seleccionados que presentan un primer episodio de trombosis venosa o arterial.

REFERENCIAS

- ROSENDAAL FR. Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1999; 82: 610-9.
- ROSENDAAL FR. Risk factors for venous thrombosis: prevalence, risk, and interaction. *Semin Hematol* 1997; 34: 171-87.
- POORT SR, ROSENDAAL FR, REITSMA PH, BERTINA RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-703.
- ROSENDAAL FR, KOSTER T, VANDENBROUCKE JP, REITSMA PH. High risk of thrombosis in patients homo-

- zygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85: 1504-8.
5. DAHLBACK B, CARLSSON M, SVENSSON PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1004-8.
 6. BERTINA RM, KOELEMAN BP, KOSTER T, ROSENDAAL FR, DIRVEN RJ, DE RONDE H ET AL. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-7.
 7. KOSTER T, ROSENDAAL FR, DE RONDE H, BRIET E, VANDENBROUCKE JP, BERTINA RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; 342: 1503-6.
 8. ENDLER G, MANNHALTER C. Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis. *Clin Chim Acta* 2003; 330: 31-55.
 9. SVENSSON PJ, DAHLBACK B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 330: 517-22.
 10. RIDKER PM, HENNEKENS CH, LINDPAINTNER K, STAMPFER MJ, EISENBERG PR, MILETICH JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995; 332: 912-7.
 11. REES DC, COX M, CLEGG JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346: 1133-4.
 12. RIDKER PM, MILETICH JP, HENNEKENS CH, BURING JE. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. *JAMA* 1997; 277: 1305-7.
 13. HEPNER M, ROLDAN A, PIERONI G, FRONTROTH JP, SERVIDDIO RM, TORRES AF ET AL. Factor V Leiden mutation in the Argentinian population. *Thromb Haemost* 1999; 81: 989.
 14. SOUTO JC, MATEO J, SORIA JM, LLOBET D, COLL I, BORRELL M ET AL. Homozygotes for prothrombin gene 20210 A allele in a thrombophilic family without clinical manifestations of venous thromboembolism. *Haematologica* 1999; 84: 627-32.
 15. SOUTO JC, ALMASY L, BORRELL M, GARI M, MARTÍNEZ E, MATEO J ET AL. Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families. *Circulation* 2000; 101: 1546-51.
 16. MITCHELL CA, JANE SM, SALEM HH. Inhibition of the anticoagulant activity of protein S by prothrombin. *J Clin Invest* 1988; 82: 2142-7.
 17. KOENEN RR, TANS G, VAN OERLE R, HAMULYAK K, ROSING J, HACKENG TM. The APC-independent anticoagulant activity of protein S in plasma is decreased by elevated prothrombin levels due to the prothrombin G20210A mutation. *Blood* 2003; 102: 1686-92.
 18. SOUTO JC, COLL I, LLOBET D, DEL RÍO E, OLIVER A, MATEO J ET AL. The prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thromb Haemost* 1998; 80: 366-9.
 19. BROWN K, LUDDINGTON R, WILLIAMSON D, BAKER P, BAGLIN T. Risk of venous thromboembolism associated with a G to A transition at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene. *Br J Haematol* 1997; 98: 907-9.
 20. ARRUDA VR, ANNICHINO-BIZZACCHI JM, GONCALVES MS, COSTA FF. Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1430-3.
 21. DE STEFANO V, CHIUSOLO P, PACIARONI K, CASORELLI I, DI MARIO A, ROSSI E ET AL. Prevalence of the factor II G20210A mutation in symptomatic patients with inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* 1998; 80: 342-3.
 22. FERRARESI P, MARCHETTI G, LEGNANI C, CAVALLARI E, CASTOLDI E, MASCOLI F ET AL. The heterozygous 20210 G/A prothrombin genotype is associated with early venous thrombosis in inherited thrombophilias and is not increased in frequency in artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2418-22.
 23. RALLIDIS LS, BELESIS CI, MANIOUDAKI HS, CHATZIOAKIMIDIS VK, FAKITSA VC, SINOS LE ET AL. Myocardial infarction under the age of 36: prevalence of thrombophilic disorders. *Thromb Haemost* 2003; 90: 272-8.
 24. ROSENDAAL FR, SISCOVICK DS, SCHWARTZ SM, PSATY BM, RAGHUNATHAN TE, VOS HL. A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; 90: 1747-50.
 25. ROSENDAAL FR, DOGGEN CJ, ZIVELIN A, ARRUDA VR, AIACH M, SISCOVICK DS ET AL. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998; 79: 706-8.

26. ARNUTTI P, NATHALANG O, COWAWINTAWEEWAT S, PRAYONWIWAT W, CHOOVICHIAN P. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in Thai patients awaiting kidney transplant. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002; 33: 869-71.
27. GAREWAL G, DAS R, AHLUWALIA J, MITTAL N, VARMA S. Prothrombin G20210A is not prevalent in North India. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2253-4.
28. DOWLING NF, AUSTIN H, DILLEY A, WHITSETT C, EVATT BL, HOOPER WC. The epidemiology of venous thromboembolism in Caucasians and African-Americans: the GATE Study. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 80-7.
29. ZALAVRAS CH G, GIOTOPOULOU S, DOKOU E, MITSIS M, IOANNOU HV, TSAOUSI C ET AL. Prevalence of the G20210A prothrombin gene mutation in Northwestern Greece and association with venous thromboembolism. *Int Angiol* 2003; 22: 55-7.
30. DE MAAT MP, BLADBIERG EM, JOHANSEN LG, GRAM J, JESPERSEN J. Absence of prothrombin mutation in Inuit (Greenland Eskimos). *Thromb Haemost* 1998; 79: 882.
31. LAHIRI DK, NURNBERGER JI JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5444.
32. CRIPE LD, MOORE KD, KANE WH. Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry* 1992; 31: 3777-85.
33. POORT SR, BERTINA RM, VOS HL. Rapid detection of the prothrombin 20210 A variation by allele specific PCR. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1157-8.
34. ALLAART CF, POORT SR, ROSENDAAL FR, REITSMA PH, BERTINA RM, BRIET E. Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency defect. *Lancet* 1993; 341: 134-8.
35. REICH LM, BOWER M, KEY NS. Role of the geneticist in testing and counseling for inherited thrombophilia. *Genet Med* 2003; 5: 133-43.
36. HATZAKI A, ANAGNOSTOPOULOU E, METAXA-MARIATOU V, MELISSINOS C, PHILALITHIS P, ILIADIS K ET AL. The impact of heterozygosity for the factor V Leiden and factor II G20210A mutations on the risk of thrombosis in Greek patients. *Int Angiol* 2003; 22: 79-82.
37. ADAMCZUK Y, IGLESIAS VARELA ML, FORASTIERO R, MARTINUZZO M, CERRATO G, POMBO G ET AL. Factor V Leiden and prothrombin G20210A variant are risk factors for venous thromboembolism in the Argentinean population. *Thromb Haemost* 2000; 83: 509-10.
38. YANQING H, FANGPING C, QINZHI X, ZAIFU J, GUANGPING W, XIAOXIA Z ET AL. No association between thrombosis and factor V gene polymorphisms in Chinese Han population. *Thromb Haemost* 2003; 89: 446-51.
39. NGUYEN A. Prothrombin G20210A polymorphism and thrombophilia. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 595-604.
40. PEREIRA J, QUIROGA T, GOYCOOLEA M, MUÑOZ B, HIDALGO P, KALTWASSER G ET AL. [Activated C protein resistance: laboratory study and prevalence of the defect in the Chilean population]. *Rev Méd Chile* 1996; 124: 663-8.
41. DEMERS C, GINSBERG JS, HIRSH J, HENDERSON P, BLAICHMAN MA. Thrombosis in antithrombin-III-deficient persons. Report of a large kindred and literature review. *Ann Intern Med* 1992; 116: 754-61.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado parcialmente por las Direcciones de Investigación de la Universidad de Talca y de la Universidad San Sebastián, Concepción.