



Biomédica

ISSN: 0120-4157

biomedica@ins.gov.co

Instituto Nacional de Salud  
Colombia

Hernández-Cuervo, Helena; Usme, Solangy; Yunis, Juan J.

Genotipos frecuentemente asociados a trombofilias

Biomédica, vol. 34, núm. 1, 2014, pp. 132-142

Instituto Nacional de Salud

Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84330488016>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en [redalyc.org](http://redalyc.org)

 redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

## REVISIÓN DE TEMA

# Genotipos frecuentemente asociados a trombofilias

Helena Hernández-Cuervo<sup>1,2</sup>, Solangy Usme<sup>1</sup>, Juan J. Yunis<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Patología Molecular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina e Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Roskamp Laboratory, Department of Psychiatry and Neurosciences, University of South Florida, Tampa, Florida, USA

<sup>3</sup> Departamento de Patología, Instituto de Genética, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>4</sup> Instituto de Genética, Servicios Médicos Yunis Turbay y Cía., Bogotá, D.C., Colombia

La enfermedad tromboembólica venosa es una entidad patológica importante debido a la morbilidad que causa, por sus complicaciones y por su alta incidencia en el mundo, la cual puede variar desde 1:100 en adultos mayores hasta 1:100.000 en niños. Existen múltiples factores de riesgo tanto genéticos como ambientales asociados a la enfermedad; los más ampliamente estudiados por su incidencia en la población mundial son el factor V de Leiden, la mutación G20210A en el factor II (protrombina) y las mutaciones en la metilen-tetrahidrofolato reductasa C677T y A1298C, que hasta hace poco se consideraban factores de riesgo.

En la presente revisión se presenta de forma concisa qué es y cómo se produce un trombo a partir de la enfermedad tromboembólica, cuáles son las principales entidades nosológicas que involucra la enfermedad y los genotipos más frecuentemente asociados a la misma. Se enfatiza en las alteraciones genéticas epidemiológicamente más importantes y se muestran brevemente los estudios realizados en Colombia.

**Palabras clave:** trombofilia, protrombina, trombosis, trombosis de la vena, embolia pulmonar.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.839>

## Frequently associated genotypes to thrombophilia

Venous thromboembolism is an important pathological entity that causes high morbidity due either to the disease or its complications. The incidence in the world ranges between 1:100 in adults and 1:100,000 in children. Risk factors for the disease include genetic as well as environmental factors. Among them, factor V Leiden (G1691A), prothrombin (G20210A) and MTHFR C677T and A1298C (which until recently were considered risk factors), have been widely studied given their impact in the world. This review presents in a clear and concise way what a thrombous is and how it is formed; how a clot is able to produce thromboembolic disease; what are the main nosological entities involved, and their main genetic causes. The most epidemiologically important genetic alterations and studies conducted in Colombia will be emphasized.

**Key words:** Thrombophilia, prothrombin, thrombosis, venous thrombosis, pulmonary embolism.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.839>

Las alteraciones de los procesos de coagulación pueden conllevar a cualquiera de dos estados: 1) hipercoagulabilidad o trombofilia (predisposición

excesiva a la formación de trombos), o 2) hipocoagulabilidad (que aumenta el riesgo de hemorragia).

Cualquier alteración o lesión en la pared de los vasos sanguíneos genera la activación de los procesos de coagulación en los que intervienen vías y factores con el fin de mantener la hemostasis y evitar la hemorragia; este proceso ocurre en tres pasos básicos que son la vasoconstricción local, la agregación plaquetaria y la formación del coágulo. La visión actual de la coagulación

---

### Correspondencia:

Helena Hernández-Cuervo, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Calle 53 Carrera 34, edificio 426, oficina 207, Bogotá, D.C., Colombia.

Teléfonos: (571) 316 5000, extensión 11605, y (571) 794 8176; fax: (571) 316 5000, extensión 11613  
marhele99@yahoo.com, mhernan5@health.usf.edu

Recibido: 09/11/12; aceptado: 26/09/13

---

### Contribución de los autores:

Solangy Usme: revisión y recopilación de la información.

Helena Hernández-Cuervo: revisión de la información, escritura y edición del documento.

Juan José Yunis: dirección del grupo de investigación y revisión del escrito.

propone que esta, más que ser una cascada que se activa por un fenómeno interno o externo (vía intrínseca y extrínseca), es un mecanismo complejo que involucra vías de señalización y metabolismo de células, además de la activación de los componentes del sistema de coagulación, cuyas fases están íntimamente relacionadas (1,2).

La trombosis es una condición clínica que puede conducir a enfermedades graves e incluso llevar a la muerte del individuo, y comprende una gran variedad de manifestaciones que dependen de la región vascular afectada por la isquemia (3). La trombosis es una enfermedad multifactorial en la que participan factores genéticos y adquiridos (4, 5); en esta condición se produce una obstrucción local del flujo sanguíneo en algún vaso arterial o venoso, lo que provoca que los tejidos y células irrigados por éste sufran de hipoperfusión con riesgo de hipoxia, isquemia o muerte (6).

La enfermedad tromboembólica venosa comprende básicamente dos entidades nosológicas: la trombosis venosa profunda y el tromboembolismo pulmonar; algunos autores incluyen también el accidente cerebrovascular de tipo tromboembólico (6). Las arterias y las venas son los sitios más frecuentes de aparición de trombosis, también pueden generarse en los capilares o en el corazón, aunque con menor frecuencia. Las complicaciones de la trombosis se originan por el efecto local de la obstrucción del flujo y el posterior desprendimiento y formación del émbolo del material trombótico, o por el consumo de elementos hemostáticos (7).

El trombo es un agregado patológico compuesto por una red con proporciones variables de fibrina y plaquetas que involucra otros componentes sanguíneos como los glóbulos rojos y los blancos. Un trombo es un coágulo que se forma en el lugar y tiempo equivocados, afectando venas, arterias, capilares o cavidades cardiacas, y sus manifestaciones clínicas, gravedad y naturaleza dependen del vaso obstruido (8). La formación de un trombo en una vena profunda (generalmente, en miembros inferiores, ya sea en muslos o piernas) da origen a la trombosis venosa profunda; el trombo venoso puede desprenderse en su totalidad o fragmentos de éste (émbolos) pueden viajar por la circulación venosa para finalmente terminar en las cavidades cardiacas derechas, y de allí avanzar hacia el sistema vascular pulmonar. El diámetro arterial a este nivel disminuye a medida que se aleja del corazón, actuando como un filtro que atrapa el émbolo y produciendo el cuadro clínico

de infarto pulmonar o tromboembolismo pulmonar. El tromboembolismo pulmonar casi siempre es secundario a una trombosis venosa profunda, razón por la que algunos autores la consideran una sola entidad clínica (6,9).

La mayoría de las trombofilias son de tipo venoso y las más raras son arteriales; las alteraciones en factores y cofactores de la coagulación, así como los inhibidores fisiológicos del sistema, son más comunes como factores de riesgo de la trombosis venosa, mientras que las alteraciones de tipo plaquetario se relacionan más con las trombosis arteriales con poca participación de las proteínas de la coagulación (1).

La trombosis venosa profunda es una enfermedad común, con una incidencia que oscila entre 1:100 en adultos mayores, 1:1.000 en adultos jóvenes y 1:100.000 en niños (6,10,11). Generalmente, la trombosis venosa profunda podría relacionarse con hiperactividad en alguna de las vías de la coagulación, hipoactividad de los mecanismos anticoagulantes y poca fibrinólisis. Se han encontrado mutaciones o variantes alélicas en los genes que codifican para la proteína C, la proteína S, la protrombina, la antitrombina y el fibrinógeno que constituyen factores de riesgo para dicha patología. También se ha informado de alteraciones en la respuesta del plasma a la proteína C activada (*Activated Protein C*, APC) conocida como resistencia a APC, la cual está dada por alteraciones en el gen que codifica para el factor V de la coagulación (12,13).

Las trombofilias pueden ser heredadas, adquiridas, o presentar ambos componentes en un solo paciente, es decir, la predisposición genética del individuo y la suma de factores desencadenantes de tipo ambiental que conllevan la trombosis (6). Entre las trombofilias heredadas más importantes por su frecuencia en la población mundial se encuentran la generada por la mutación del factor V de la coagulación (denominado factor V de Leiden), y la mutación en el gen de la protrombina (factor II de la coagulación) en posición G20210A. Anteriormente se creía que las mutaciones de la metilen-tetrahidrofolato reductasa C677T y A1298C eran factores determinantes en el abordaje genético de la trombosis, pero estudios más recientes han desvirtuado dicha hipótesis y han demostrado en algunos grupos de población que la existencia de niveles elevados de homocisteína, no necesariamente ligada con estos polimorfismos, se relaciona con la aparición de un primer evento de trombosis venosa (10,14,15).

Por otra parte, los estudios de asociación del genoma completo (*Genome-Wide Association Study, GWAS*) y otros estudios genéticos más recientes han puesto en evidencia una estrecha relación entre las alteraciones genéticas encontradas en algunos *loci* y la aparición de trombofilias; entre estas variaciones se encuentran las presentadas en los alelos A y B que codifican para el grupo sanguíneo ABO, las mutaciones en los genes que codifican para anticoagulantes naturales como antitrombina II y III (por ejemplo, antitrombina Cambridge II) o deficiencias en los mismos, el SNP C46T en el factor XII, variaciones en los niveles de la proteína C y la proteína S de la coagulación, las disfibrinogenemias y la homocisteinuria, entre otras (4,16-22).

Se conocen como trombofilias adquiridas aquellas pertenecientes a un grupo de entidades nosológicas que conllevan estados de hipercoagulabilidad con las alteraciones genéticas heredadas conocidas o sin ellas; en este grupo se encuentran el síndrome antifosfolípido, el lupus eritematoso sistémico, la resistencia a la proteína C activada sin alteraciones en el gen del factor V, la hiperhomocisteinemia leve o moderada sin alteraciones en la MTHFR, las variaciones en la actividad de los factores VIII (en éste también pueden ser de origen genético), IX y XI de la coagulación, el síndrome de plaqueta pegajosa y el cáncer (23,24).

La importancia del estudio de las trombofilias heredadas o adquiridas se basa en su relación con enfermedades como la trombosis venosa profunda, el tromboembolismo pulmonar y, en menor proporción pero no menos importante, con el infarto agudo del miocardio, el ataque cerebrovascular y la pérdida gestacional recurrente, ya sean de origen primario o secundario a otras enfermedades y depende del tipo de abordaje que realice cada médico tratante y su concepto acerca del manejo de la enfermedad (25).

### Principales alteraciones genéticas

Algunas mutaciones o variantes alélicas en los genes que codifican para la proteína C, la proteína S, la protrombina, la antitrombina y el fibrinógeno se han descrito como factores de riesgo para la trombosis, así como las alteraciones en la respuesta plasmática a la proteína C activada (resistencia a APC) dadas por la presencia de la mutación en el factor V Leiden (16,26-29). La proteína C activada es una proteasa de serina con propiedad anticoagulante, la cual se activa en el endotelio vascular a partir de su precursor inactivo,

la proteína C (4). Durante la hemostasia normal, la APC limita la formación del coágulo por inactivación proteolítica de los factores Va y VIIIa (4,5,26). La resistencia a APC o respuesta APC débil se asocia a la heterocigocidad o a la homocigocidad para la mutación puntual en el gen del factor V Leiden. De la misma manera, el polimorfismo en la posición G20210A del gen de la protrombina (30-33) se ha asociado a trombofilias heredadas o adquiridas, a la enfermedad tromboembólica venosa, al ataque cerebrovascular y a la pérdida gestacional recurrente.

### Factor V

La proteína C es una glucoproteína con propiedad anticoagulante dependiente de la vitamina K que se forma en el hígado principalmente, pero que también se encuentra en plaquetas, monocitos y células epiteliales. Durante la hemostasia normal, la APC limita la formación del coágulo por inactivación proteolítica de los factores Va y VIIIa; para su actividad requiere ser activada por la trombina para convertirse en APC, activación que es más eficiente en presencia de trombomodulina y de un receptor de proteína C endotelial (4,5,26). La proteína S es una glucoproteína dependiente de la vitamina K que actúa como cofactor no enzimático y hace que los factores Va y VIIIa sean más accesibles a la escisión mediada por la APC; durante la hemostasia normal, la APC hidroliza el factor V activado (FVa) y el factor VIII activado (FVIIIa) produciendo su inactivación (4). El factor V activado (FVa) participa en la activación de la protrombina, haciendo parte del complejo protrombinasa (34,35). Si esto no ocurre, se considera que hay resistencia a la proteína C activada.

El factor V de la coagulación (FV), proacelerina o factor lábil, es sintetizado en el hígado, no es activo enzimáticamente, circula por el plasma libre como una cadena polipeptídica simple en una forma procoagulante inactiva y actúa como cofactor de la APC en la inactivación del factor VIIIa (36-38). El gen que codifica para el FV se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 (1q23). Las mutaciones en el gen del factor V de la coagulación se han informado en varios estudios. El FV Cambridge se origina cuando la proteína del FV sufre un cambio de arginina a treonina en el residuo 306, produciendo una alteración en el segundo punto de corte por parte de la APC, lo que da como resultado la resistencia a la APC (39, 40); también se ha encontrado una alteración con predominio en población asiática que consiste en

el cambio de arginina a glicina en la posición 306 de la proteína del FV, la cual no está asociada a resistencia a la APC y ha sido denominada FV Hong Kong (41).

El factor V de Liverpool es una mutación con pérdida de sentido en otro SNP (*single-nucleotide polymorphism*) relacionado con resistencia a la APC y está dado por el cambio de una tiamina a una citosina en la posición 1250 también conocida como FV-Ile359Thr; al parecer, sus manifestaciones clínicas solo se presentan cuando coexiste con otra mutación sin sentido conocida como FV G529T. Sin embargo, los estudios realizados hasta ahora en Latinoamérica no revelan la presencia de esta alteración en este lado del globo (42,43). El haplotipo HR2 o FV-HR2, cuyo SNP más comúnmente evaluado es el A4070G (prueba genética realizada en Estados Unidos en pacientes con trombosis venosa profunda y tromboembolismo pulmonar secundario), incluye otros tres SNP y se ha relacionado con resistencia a la APC y eventos tromboembólicos con presencia del FVL o sin ella (44-47).

En 1994, Bertina y su grupo de colaboradores en Leiden, Holanda, descubrieron la mutación del factor V conocida como FV de Leiden (FVL, FV G1691A o FV R506Q), la cual estaba presente en más de 80 % de los pacientes con resistencia a la APC y consiste en un cambio de guanina por adenina en el nucleótido 1691, que codifica para un cambio en el codón 506, sustituyendo una arginina por glutamina. Esta mutación se relaciona con la resistencia a la proteína C activada, produciendo una degradación alterada del FVa por una alteración en el punto de clivaje y por su incapacidad para actuar como cofactor en la escisión del FVIIIa (26,38).

El FV de Leiden es la anomalía molecular más frecuente en población caucásica; la prevalencia varía según la composición étnica y la localización geográfica (2-13 %) (48,49). Los individuos heterocigotos para el FV de Leiden tienen un riesgo relativo ocho veces mayor de desarrollar una trombosis venosa, en tanto que en homocigotos para la mutación, el riesgo puede ser hasta de 90 veces mayor (50). La resistencia a APC es de transmisión autosómica dominante, al igual que la mutación G1691A en el FV (51) (cuadro 1).

### Protrombina

La protrombina o factor II de la coagulación es una proteína dependiente de la vitamina K que se transforma en trombina (proteasa de serina) y

convierte el fibrinógeno en fibrina en el proceso de coagulación. La protrombina se encuentra codificada en el cromosoma 11 en posición 11p11; el gen posee 14 exones separados por 13 intrones en sentido 5' y una región no traducida en sentido 3', la cual juega un rol importante en la expresión génica. En 1996, Poort, *et al.*, identificaron un polimorfismo de nucleótido simple en la posición 20210 del gen de la protrombina (en la región UTR 3') consistente en un cambio de guanina por adenina después del sitio de poliadenilación, el cual se asocia con altos niveles de protrombina (5).

La concentración de protrombina encontrada en pacientes heterocigotos para el polimorfismo G20210A es >1,15 U/ml (aproximadamente, un aumento de 25 % de la concentración habitual), lo que dobla el riesgo de trombosis venosa profunda en la población general y lo incrementa en seis veces en personas con antecedente previo de trombosis venosa profunda (OR=3 (30,31). Esta mutación es la segunda en frecuencia después del factor V de Leiden en pacientes con trombosis venosa (31,54).

### Metilen-tetrahidrofolato reductasa

El gen que codifica para la enzima metilen-tetrahidrofolato reductasa sintetiza 5-metil-tetrahidrofolato, primera forma circulatoria de folato, que actúa como donador de metil para la remetilación de la homocisteína (6). La homocisteína es un aminoácido azufrado que se sintetiza en el organismo a partir de la metionina, circula en la sangre como tiol puro en bajas concentraciones y se halla como disulfuro unido a residuos de cisteína de las proteínas. Este compuesto puede seguir dos rutas en su metabolismo, la de nueva metilación y la de transulfuración. La primera da lugar a la regeneración de metionina y la segunda a la formación de cisteína. Debido a su rápida utilización metabólica, este aminoácido se encuentra en bajas concentraciones en el plasma. En casos de alteraciones genéticas que modifiquen las vías enzimáticas involucradas en el metabolismo de la homocisteína, el ácido fólico, la vitamina B<sub>6</sub> y la B<sub>12</sub>, se produce una elevación del aminoácido y, por ende, un incremento en el desarrollo de enfermedades o alteraciones debidas al mismo, por ejemplo, las cardiovasculares, las alteraciones en el desarrollo del tubo neural, el daño vascular, etc. (4,55).

Varias mutaciones y polimorfismos se han descrito para este gen, y se ha propuesto el polimorfismo C677T como un factor de riesgo para la enfermedad vascular y la ateroesclerosis debido a la reducción de la actividad enzimática y a la elevación de los

**Cuadro 1.** Mutaciones del factor V

Variante	Cambio en nucleótido	Cambio en aminoácido	Aumento en riesgo de trombosis	Referencia
Factor V de Leiden	G1691A	R506Q	Sí	Bertina, <i>et al.</i> , 1994 (26)
Factor V de Cambridge	G1091C	R306T	Sí	Franco, <i>et al.</i> , 1998, 1999 (39,40)
Factor V de Hong Kong	A1090G	R306G	No	Norstrom, <i>et al.</i> , 2002 (52)
Factor V de Liverpool	T1250C	I359T	Sí	Steen, <i>et al.</i> , 2004
Haplótipo HR2	A4070G	H1299R	Sí, en algunos grupos de población	Bouaziz-Borgi, <i>et al.</i> , 2007 (44,47)
Mutación R485K	G1628A	R485K	Sí	Faisel, <i>et al.</i> , 2004 (53)

niveles de homocisteína en plasma (56-59). En 1995, el grupo de Frosst identificó la sustitución de una citosina por una timina en el nucleótido 677, la cual convierte un residuo de alanina en valina, y se relaciona con la reducción de la actividad enzimática y el incremento de la termolabilidad de los extractos linfocitarios (57,60). La mutación C677T de metilen-tetrahidrofolato reductasa se ha relacionado con la enfermedad arterial oclusiva y el accidente isquémico transitorio, entre otras muchas enfermedades (por ejemplo, defectos del tubo neural y retardo mental). Esta alteración había sido ligada a la enfermedad tromboembólica venosa, pero actualmente se conoce que no existe una relación causal entre su existencia y la aparición de la enfermedad tromboembólica (6,14, 15,61,62). En 2008 se publicaron los resultados del estudio HUNT2 (*Second Norwegian Health Study of Nord-Trøndelag*), los cuales evidenciaron que los altos niveles de homocisteína no tenían relación con la presencia del polimorfismo C677T en el gen de la metilen-tetrahidrofolato reductasa; no obstante, encontraron una relación de estos niveles elevados de homocisteína con la aparición de un primer evento trombótico venoso en hombres, pero dicha relación no prevalecía en mujeres (10).

En 1998, van der Put, *et al.*, encontraron otro polimorfismo de nucleótido único que en forma homocigota o heterocigota se relaciona con un descenso de la actividad enzimática sin alteraciones en las concentraciones de homocisteína o de folato como sí sucede con la mutación C677T de la misma enzima y que, al parecer, se encuentran relacionadas entre sí (60).

### Otras alteraciones genéticas importantes

Son bien conocidas otras variantes genéticas que se relacionan estrechamente con el riesgo de enfermedad tromboembólica, pero que no serán explicadas ampliamente en esta revisión; entre ellas se cuentan las siguientes.

1. La antitrombina Cambridge II (A384S): una mutación genética con cambio de sentido estudiada desde su identificación en 1991, muestra una alta incidencia en poblaciones británicas en las que se ha relacionado con enfermedad tromboembólica venosa; de estudios recientes se deduce que el remplazo de la arginina por un residuo de serina no conlleva una pérdida total de la actividad antitrombina, aunque puede disminuir los niveles de esta serpina y, a la vez, los de anti-Xa y anti-IIa, dificultando el manejo de la anticoagulación que involucra el metabolismo de la heparina en pacientes que cursan con otras alteraciones genéticas como el FV de Leiden y la mutación G20210A del FII (19,63).

2. La proteína Z es una serpina que actúa dependiente del inhibidor de proteasa ZPI, el cual funciona como su cofactor y con el que se une para dar origen al complejo PZ/ZPI; se le considera similar al formado por la proteína C, proteína S y la antitrombina. Las mutaciones R67X y W303X son mutaciones sin sentido que producen como resultado deficiencia de la proteína Z, impidiendo así la inhibición de los factores Xa, Xla y IXa y favoreciendo los estados trombóticos (65,66).

3. Los estudios de genoma completo han mostrado una asociación importante de los alelos A y B del grupo sanguíneo ABO, como determinantes genéticos de la enfermedad tromboembólica, y el infarto agudo de miocardio comparados con individuos del grupo O, así como de otras variantes genéticas tales como SERPINC1, PROC, PROS1 y FGG (20-22).

### Metodologías para la determinación de FV de Leiden, C677T de la metilen-tetrahidrofolato reductasa y protrombina G20210A en paralelo

Los estudios iniciales de las alteraciones genéticas se han realizado usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual un segmento blanco es amplificado para, posteriormente, efectuar en él

un corte mediante el uso de enzimas de restricción. En este proceso, conocido como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), las enzimas de digestión se encargan de reconocer secuencias específicas que incluyen el locus buscado y realizan escisión del amplicón (fragmento amplificado mediante PCR), creando fragmentos más pequeños y de tamaños conocidos que permiten la identificación genotípica posterior mediante el corrido en geles de agarosa o poliacrilamida según sea el caso (5,26,56).

Múltiples estudios han investigado la existencia del factor V de Leiden, la mutación C677T y el polimorfismo G20210A de la protrombina, por separado o en conjunto, y su posible relación con la enfermedad tromboembólica venosa, el ataque cerebrovascular y otras enfermedades, así como el empleo de diferentes métodos para su detección.

Lalouscheck, *et al.*, encontraron que la presencia conjunta del factor V de Leiden y la mutación C677T en el gen de la metilen-tetrahidrofolato reductasa en pacientes con accidente isquémico transitorio es baja, pero que su presencia empeora el curso clínico de la enfermedad (58). Ese mismo año, De Stefano encontró un riesgo aumentado de recurrencia de trombosis venosa profunda en pacientes positivos para FV de Leiden y protrombina G20210A (64). Por otro lado, Cattaneo encontró un aumento en el riesgo de recurrencia de trombosis venosa profunda en pacientes con la mutación G20210A de protrombina y FV de Leiden, riesgo independiente de la coexistencia de la protrombina G20210A y metilen-tetrahidrofolato reductasa C677T, en tanto que el aumento en la concentración plasmática de protrombina se relacionó con la existencia de las tres mutaciones (65).

En el 2005, Mueller, *et al.*, evaluaron un grupo de 433 pacientes con diagnóstico de enfermedad arterial periférica buscando establecer la correlación entre la alteración y el FV de Leiden, C677T enfermedad arterial periférica y protrombina G20210A, sin encontrar relación significativa entre la presencia de las mutaciones y la enfermedad arterial periférica en el grupo de estudio (66). En el 2005, Angelini, *et al.*, determinaron la prevalencia del factor V de Leiden y la protrombina G20210A en una población del sur de la India, y encontraron frecuencias similares a las reportadas para FV en otras poblaciones del mundo, y la ausencia del polimorfismo G20210A de la protrombina en la población estudiada (67).

La determinación de los tres genes se ha venido realizando en paralelo desde 1999; en ese año, von Ahsen, *et al.*, realizaron una PCR múltiple en tiempo real empleando sondas FRET para la amplificación de los tres genes y encontraron que su método era más rápido que los anteriormente usados en la detección de estas mutaciones protrombóticas (68). En el 2000, von Ahsen realizó la determinación de FV de Leiden y enfermedad arterial periférica C677T empleando PCR múltiple en tiempo real y encontró poca eficiencia en la técnica, lo que explicó aduciendo problemas en el diseño de los cebadore y la baja temperatura de disociación (*melting*) empleada en la PCR múltiple (69). El mismo año, el grupo de Huber desarrolló una PCR múltiple para la amplificación del FV de Leiden y la protrombina G20210A con posterior restricción con endonucleasa Hind III en pacientes previamente evaluados para factor V de Leiden, encontrando una concordancia del 100 % entre las dos metodologías empleadas (30). El grupo presentó la PCR múltiple como una alternativa rápida y económica en la determinación de estas dos mutaciones. Angelini, *et al.*, identificaron estos tres factores de riesgo genético empleando PCR múltiple específica de alelo y variando el método de obtención de ADN en busca de una técnica rápida, fácil y económica (70). En el 2007, Koksal y su grupo presentaron una modificación en los cebadores empleados para la amplificación simultánea del FV de Leiden, metilen-tetrahidrofolato reductasa C677T y protrombina G20210A (PCR múltiple) con el fin de crear un sitio de restricción para la enzima de digestión (Mnl I) y lograr un método más rápido, fácil y económico que se pudiera implementar en la determinación rutinaria de laboratorio (71).

#### **Mutaciones en el FV de Leiden, la protrombina G20210A y la metilen-tetrahidrofolato reductasa en Colombia**

En 1996, Dennis, *et al.*, encontraron que, aproximadamente, 7 % de la población evaluada (colombianos hospitalizados por los servicios de medicina interna, ortopedia y cirugía) presentaban, al menos, un episodio de trombosis venosa profunda. Se estima que en Colombia (40 millones de habitantes) existen entre 40.000 y 72.000 nuevos casos de metilen-tetrahidrofolato reductasa al año (72). Sánchez, *et al.*, reportaron una incidencia acumulada de 21,5 % de eventos tromboembólicos después de un primero episodio de trombosis venosa profunda en cinco años, y de 27,9 % después de un segundo evento de trombosis venosa profunda, siendo el cáncer y la

historia de tromboembolismo venoso los mayores factores de riesgo para la recurrencia de la trombosis venosa proximal (73).

Camacho, *et al.*, realizaron la determinación del FV de Leiden y metilen-tetrahidrofolato reductasa C677T en 150 individuos escogidos al azar (74). Ninguno era portador de la mutación para el factor V de Leiden, mientras que la mutación C677T de la metilen-tetrahidrofolato reductasa estaba presente en 48,7 % de los individuos. En otro estudio, Camacho, *et al.* (75), analizaron 170 pacientes con trombosis y 148 controles para la mutación del factor V de Leiden. La mutación se encontró en 4,1 % de los pacientes y en 0,6 % de los controles.

En estudios realizados al respecto, Varela refirió una prevalencia mayor para el factor V de Leiden en donantes de banco de sangre en cuatro ciudades colombianas y Bermúdez determinó una frecuencia de 51 % de la mutación C677T de la metilen-tetrahidrofolato reductasa en población colombiana sana (76,77).

Torres, *et al.*, analizaron 100 pacientes con trombosis venosa profunda y 114 controles. La mutación del factor V de Leiden estaba presente en 10 % de los pacientes comparado con 0,9 % de los controles. La mutación G20210A estaba presente en 4 % de los pacientes y en ninguno de los controles. La mutación MTFHR C677T de la metilen-tetrahidrofolato reductasa estaba presente en 73 % de los pacientes (24 % homocigotos y 49 % heterocigotos), y en 68,4 % de los controles (19,3 % homocigotos y 49,1 % heterocigotos) (78).

González, *et al.*, evaluaron la existencia de la mutación C677T de la metilen-tetrahidrofolato reductasa en estudiantes universitarios, de los cuales, 63 % era portador de la mutación (11 % homocigóticos y 62 % heterocigóticos) (79).

Recientemente, en el 2008, el Grupo de Patología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia inició un estudio para determinar cuatro mutaciones relacionadas con trombofilia en pacientes y en un grupo control de la población colombiana empleando la metodología de Koksal y van der Put, cuya publicación de resultados se encuentra en revisión en una revista internacional. En este estudio el grupo analizó 128 pacientes y 597 controles pertenecientes a los tres principales grupos étnicos colombianos: caucasoides (n=200), afrodescendientes (n=200) y amerindios (n=197). La frecuencia alélica de la mutación del factor V

de Leiden en pacientes fue de 8,6 % mientras que en los grupos control fue inferior a 1 %; la mutación G20210A se presentó en 0,8 % de los pacientes y en ninguno de los controles; la mutación C677T del gen de la metilen-tetrahidrofolato reductasa estaba presente en 45 % de los pacientes y varió en frecuencia en los tres grupos control (frecuencias entre 22 y 49 %), y la mutación A1298C estaba presente en cerca de 19 % de los pacientes y en los grupos control varió entre 8 y cerca de 16 % (Hernández-Cuervo, *et al.*, 2014, en revisión).

### Conclusiones

Diversas mutaciones en los factores de la coagulación se han asociado con la tendencia a la trombofilia, entre ellas se encuentran las alteraciones en el factor V de la coagulación, siendo el factor V de Leiden la mejor conocida y comúnmente estudiada, el cual ha demostrado ser un factor de riesgo importante para la enfermedad tromboembólica en nuestra población, con prevalencias que pueden variar entre 2 y 3 %.

Seguida de esta se encuentra la mutación C677T en el gen de la metilen-tetrahidrofolato reductasa que, si bien no hace parte de la vía de la coagulación, sí se asocia en algunos casos a incrementos en los niveles de homocisteína que se asocian a la enfermedad tromboembólica; no obstante, existe una alta prevalencia del polimorfismo en nuestras poblaciones sanas, lo que permite concluir que la presencia del alelo mutado no muestra una relación estadísticamente significativa con el aumento en el riesgo de desarrollar la enfermedad tromboembólica.

Los resultados encontrados por el grupo son coincidentes con los informados al respecto en la literatura indexada. La mutación G20210A en el factor II (protrombina) definitivamente se relaciona altamente con el riesgo de padecer una de las entidades nosológicas asociadas a la formación de trombos, pero esta es poco frecuente en la población colombiana hasta ahora estudiada.

Se recomienda realizar estudios complementarios en estos y otros genes relacionados con el riesgo de padecer la enfermedad que podrían cobrar importancia en nuestra población (HR2, FV de Cambridge, FV de Liverpool, PAI 4G/5G, grupo ABO), así como aumentar el número de pacientes con enfermedad tromboembólica estudiados, de forma tal que los resultados obtenidos sean concluyentes.

### Conflictos de intereses

Los autores del presente trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

### Financiación

Universidad Nacional de Colombia, Convocatoria Nacional de Investigación, proyecto N° 7445.

### Referencias

1. Páramo JA, Panizo E, Pegenauta C, Lecumberri R. Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia. Rev Med Univ Navarra. 2009;53:19-23.
2. Rao LV, Pendurthi UR. Tissue factor-factor VIIa signaling. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25:47-56. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000151624.45775.13>
3. Godoi LC, Fernandes AP, Vieira LM, Melgaco DA, de Bastos M, Ribeiro Mde F, et al. Hypercoagulability markers in young asymptomatic heterozygous carriers of factor V Leiden (G1691A) or prothrombin (G20210A) variant. Clin Chim Acta. 2006;365:304-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2005.09.010>
4. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. Blood. 1996;87:3531-44.
5. 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.
6. González-Porras JR, Pérez-López E, Alberca I, Lozano FS. Influencia de la mutación C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa en la enfermedad tromboembólica venosa. Angiología. 2010;62:225-31. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-3170\(10\)70053-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-3170(10)70053-5)
7. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Statins and blood coagulation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25:287-94. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000151647.14923>
8. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. N Engl J Med. 2008;359:938-49. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0801082>
9. Villagómez AE, Alcántar E, Avelar F, Ayala E, Bautista E, Cabrera A, et al. Guías para el diagnóstico, prevención y tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa. Revista Mexicana de Anestesiología. 2006;29:303-34.
10. Naess IA, Christiansen SC, Romundstad PR, Cannegieter SC, Blom HJ, Rosendaal FR, et al. Prospective study of homocysteine and MTHFR 677TT genotype and risk for venous thrombosis in a general population--results from the HUNT 2 study. Br J Haematol. 2008;141:529-35. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07073>
11. Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombosis: Prevalence, risk, and interaction. Semin Hematol. 1997;34:171-87.
12. Coen D, Zadro R, Honovic L, Banfic L, Stavlijenic Rukavina A. Prevalence and association of the factor V Leiden and prothrombin G20210A in healthy subjects and patients with venous thromboembolism. Croat Med J. 2001;42:488-92.
13. Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306-->Thr) associated with resistance to activated protein C. Blood. 1998;91:1140-4.
14. 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. 2007;167:497-501. <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.167.5.497>
15. Varela ML, Adamczuk YP, Forastiero RR, Martinuzzo ME, Cerrato GS, Pombo G, et al. Major and potential prothrombotic genotypes in a cohort of patients with venous thromboembolism. Thromb Res. 2001;104:317-24. [http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848\(01\)00384-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(01)00384-X)
16. van Cott EM, Soderberg BL, Laposata M. Activated protein C resistance, the factor V Leiden mutation, and a laboratory testing algorithm. Arch Pathol Lab Med. 2002;126:577-82. [http://dx.doi.org/10.1043/0003-9985\(2002\)126<0577:APC](http://dx.doi.org/10.1043/0003-9985(2002)126<0577:APC) RTF>2.0.CO;2
17. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, et al. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. N Engl J Med. 1999;341:801-6. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199909093411104>
18. López M, Giraldo P, Álvarez P, Cornudella R, Pocovi M, Martínez A, et al. Multiplex assay for genetic testing of thrombophilia: A method for routine clinical care. J Clin Lab Anal. 2007;21:349-55. <http://dx.doi.org/10.1002/jcl.a.20183>
19. Sanchez C, Alessi MC, Saut N, Aillaud MF, Morange PE. Relation between the antithrombin Cambridge II mutation, the risk of venous thrombosis, and the endogenous thrombin generation. J Thromb Haemost. 2008;6:1975-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03144.x>
20. Heit JA, Armasu SM, Asmann YW, Cunningham JM, Matsumoto ME, Petterson TM, et al. A genome-wide association study of venous thromboembolism identifies risk variants in chromosomes 1q24.2 and 9q. J Thromb Haemost. 2012;10:1521-31. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04810.x>
21. Oudot-Mellakh T, Cohen W, Germain M, Saut N, Kallel C, Zelenika D, et al. Genome wide association study for plasma levels of natural anticoagulant inhibitors and protein C anticoagulant pathway: The MARTHA project. Br J Haematol. 2012;157:230-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.09025.x>
22. Germain M, Saut N, Greliche N, Dina C, Lambert JC, Perret C, et al. Genetics of venous thrombosis: Insights from a new genome wide association study. PloS One. 2011;6:e25581. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025581>
23. Moll S. Testing for thrombophilias. Clin Adv Hematol Oncol. 2008;6:646-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s11936-009-0012-x>
24. Castañeda SA, Cardona WD, Cadavid AP. Trombofilias heredadas y pérdida gestacional recurrente. IATREIA. 2002;15:170-7.
25. García VV. ¿Existe una predisposición genética a padecer trombosis? Discurso Académico. Murcia: Academia de Ciencias de la Región de Murcia; 2004.
26. 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. <http://dx.doi.org/10.1038/369064a0>
27. Christiansen SC, Lijfering WM, Naess IA, Hammerstrom J, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, *et al.* The relationship between body mass index, activated protein C resistance and risk of venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2012;10:1761-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04828.x>
28. Koster T, Rosendaal FR, Briet E, van der Meer FJ, Collly LP, Trienekens PH, *et al.* Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: An infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood*. 1995;85:2756-61.
29. Mazzolai L, Duchosal MA. Hereditary thrombophilia and venous thromboembolism: Critical evaluation of the clinical implications of screening. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2007;34:483-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2007.04.023>
30. Huber S, McMaster KJ, Voelkerding KV. Analytical evaluation of primer engineered multiplex polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for detection of factor V Leiden and prothrombin G20210A. *J Mol Diagn*. 2000;2:153-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60631-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60631-9)
31. Perez-Ceballos E, Corral J, Alberca I, Vaya A, Llamas P, Montes R, *et al.* Prothrombin A19911G and G20210A polymorphisms' role in thrombosis. *Br J Haematol*. 2002;118:610-4. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03624.x>
32. Slavik L, Krcova V, Hlusi A, Prochazkova J, Ulehlova J. Molecular methods in thrombophilic states diagnostics. *Vnitr Lek*. 2009;55:302-9. <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-923-0:107>
33. Francès F, Portolès O, Gabriel F, Corella D, Sorlí JV, Sabater A, *et al.* Comparación de las frecuencias de los alelos factor V Leiden (G1691A) y protrombina-G20210A entre pacientes con trombosis venosa profunda y población general mediterránea española. *Rev Méd Chile*. 2006;134:13-20. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872006000100002>
34. 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. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.3.1004>
35. Dahlback B. Resistance to activated protein C caused by the factor VR506Q mutation is a common risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 1997;78:483-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s002770050157>
36. Perez-Pujol S, Aras O, Escolar G. Factor V Leiden and inflammation. *Thrombosis*. 2012;2012:594986. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/594986>
37. Rosing J, Tans G. Coagulation factor V: An old star shines again. *Thromb Haemost*. 1997;78:427-33.
38. Dahlback B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood*. 2008;112:19-27. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-01-077909>
39. Franco RF, Elion J, Tavella MH, Santos SE, Zago MA. The prevalence of factor V Arg306-->Thr (factor V Cambridge) and factor V Arg306-->Gly mutations in different human populations. *Thromb Haemost*. 1999;81:312-3.
40. Franco RF, Maffei FH, Lourenco D, Morelli V, Thomazini IA, Piccinato CE, *et al.* Factor V Arg306-->Thr (factor V Cambridge) and factor V Arg306-->Gly mutations in venous thrombotic disease. *Br J Haematol*. 1998;103:888-90. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.01051.x>
41. Hiyoshi M, Hashimoto S, Tagawa S, Arnutti P, Prayoonwiwat W, Tatsumi N. A Thai patient with the mutation of Arg306 of FV gene identical to the Hong Kong but not to the Cambridge type. *Thromb Haemost*. 1999;82:1553-4.
42. Steen M, Norstrom EA, Tholander AL, Bolton-Maggs PH, Mumford A, McVey JH, *et al.* Functional characterization of factor V-Ile359Thr: A novel mutation associated with thrombosis. *Blood*. 2004;103:3381-7. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-06-2092>
43. Ruiz-Arguelles GJ, Poblete-Naredo I, Reyes-Nunez V, Garces-Eisele J, Lopez-Martinez B, Gomez-Rangel JD. Primary thrombophilia in Mexico IV: Frequency of the Leiden, Cambridge, Hong Kong, Liverpool and HR2 haplotype polymorphisms in the factor V gene of a group of thrombophilic Mexican Mestizo patients. *Rev Invest Clin*. 2004;56:600-4.
44. Otrock ZK, Taher AT, Shamseddine WA, Zaatari G, Bazarbachi A, Mahfouz RA. Factor V HR2 haplotype: a risk factor for venous thromboembolism in individuals with absence of Factor V Leiden. *Ann Hematol*. 2008;87):1013-6. <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-008-0543-3>
45. Pechenik NM, Morris CP, Walsh TP, Marsh NA. The factor V HR2 haplotype: Prevalence and association of the A4070G and A6755G polymorphisms. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2001;12:201-6.
46. Galati G, Gentilucci UV, Mazzarelli C, Gallo P, Grasso RF, Stellato L, *et al.* Deep vein thrombosis, inferior vena cava interruption and multiple thrombophilic gene mutations. *Am J Med Sci*. 2011;342:79-82. <http://dx.doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3182172758>
47. Bouaziz-Borgi L, Nguyen P, Hezard N, Musharrafieh U, Almawi WY, Mahjoub T. A case control study of deep venous thrombosis in relation to factor V G1691A (Leiden) and A4070G (HR2 Haplotype) polymorphisms. *Exp Mol Pathol*. 2007;83:480-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2007.04.006>
48. Olie V, Zhu T, Martinez I, Scarabin PY, Emmerich J. Sex-specific risk factors for recurrent venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2012;130:16-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2011.10.026>
49. Dashti AA, Jadaon MM, Abdulsamad AM, Dashti MH, Lewis HL. Thrombosis risk in carriers of the factor V Leiden mutation: Is it associated with a defined skin color? *Pathol Res Pract*. 2011;207:671-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2011.07.013>
50. Bertina RM. Factor V Leiden and other coagulation factor mutations affecting thrombotic risk. *Clin Chem*. 1997;43:1678-83.
51. Dietrich JE, Hertweck SP, Perlman SE. Efficacy of family history in determining thrombophilia risk. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2007;20:221-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpag.2006.11.008>
52. Norstrom E, Thorelli E, Dahlback B. Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and

- FV Cambridge. *Blood*. 2002;100:524-30. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2009.017616>
53. **Faisel F, Romppanen EL, Hiltunen M, Helisalmi S, Laasanen J, Punnonen K, et al.** Susceptibility to pre-eclampsia in Finnish women is associated with R485K polymorphism in the factor V gene, not with Leiden mutation. *Eur J Hum Genet*. 2004;12:187-91. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201124>
54. **Nagaraja D, Kruthika-Vinod TP, Christopher R.** The prothrombin gene G20210A variant and puerperal cerebral venous and sinus thrombosis in South Indian women. *J Clin Neurosci*. 2007;14:635-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2006.05.001>
55. **Pepe G, Camacho Vanegas O, Giusti B, Brunelli T, Marcucci R, Attanasio M, et al.** Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet*. 1998;63:917-20.
56. **Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al.** A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995;10: 111-3. <http://dx.doi.org/10.1038/ng0595-111>
57. **Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R.** A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 1998;64:169-72. <http://dx.doi.org/10.1006/mgme.1998.2714>
58. **Lalouschek W, Aull S, Korninger L, Mannhalter C, Pabinger-Fasching I, Schmid RW, et al.** 677C to T mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and plasma homocyst(e)ine levels in patients with TIA or minor stroke. *J Neurol Sci*. 1998;155:156-62. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-510X\(97\)00311-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-510X(97)00311-0)
59. **Lalouschek W, Schillinger M, Hsieh K, Endler G, Tentschert S, Lang W, et al.** Matched case-control study on factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation in patients with ischemic stroke/transient ischemic attack up to the age of 60 years. *Stroke*. 2005;36:1405-9. <http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.0000170635.45745.b8>
60. **van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al.** A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet*. 1998;62:1044-51. <http://dx.doi.org/10.1086/301825>
61. **Alessio AC, Annichino-Bizzacchi JM, Bydlowski SP, Eberlin MN, Vellasco AP, Hoehr NF.** Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. *Am J Med Genet A*. 2004;128A:256-60. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.30108>
62. **Cortese C, Motti C.** MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutr*. 2001;4:493-7. <http://dx.doi.org/10.1079/PHN2001159>
63. **Corral J, Hernandez-Espinosa D, Soria JM, Gonzalez-Conejero R, Ordonez A, Gonzalez-Porras JR, et al.** Antithrombin Cambridge II (A384S): An underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood*. 2007;109:4258-63. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-08-040774>
64. **De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Leone G.** Epidemiology of factor V Leiden: Clinical implications. *Semin Thromb Hemost*. 1998;24:367-79. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-996025>
65. **Cattaneo M, Chantarangkul V, Taioli E, Santos JH, Tagliabue L.** The G20210A mutation of the prothrombin gene in patients with previous first episodes of deep-vein thrombosis: Prevalence and association with factor V G1691A, methylenetetrahydrofolate reductase C677T and plasma prothrombin levels. *Thromb Res*. 1999;93:1-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848\(98\)00136-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(98)00136-4)
66. **Mueller T, Marschon R, Dieplinger B, Haidinger D, Gegenhuber A, Poelz W, et al.** Factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations are not associated with chronic limb ischemia: The Linz Peripheral Arterial Disease (LIPAD) study. *J Vasc Surg*. 2005;41:808-15. [http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848\(98\)00136-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(98)00136-4)
67. **Angeline T, Bentley HA, Hawk AB, Manners RJ, Mokashi HA, Jeyaraj N, et al.** Prevalence of the Factor V G1691A and the Factor II/prothrombin G20210A gene polymorphisms among Tamilians. *Exp Mol Pathol*. 2005;79:9-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2005.03.003>
68. **von Ahsen N, Schutz E, Armstrong VW, Oellerich M.** Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), factor V (G1691A), and methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) by real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clin Chem*. 1999;45:694-6.
69. **von Ahsen N, Oellerich M, Schutz E.** A method for homogeneous color-compensated genotyping of factor V (G1691A) and methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) mutations using real-time multiplex fluorescence PCR. *Clin Biochem*. 2000;33:535-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-9120\(00\)00161-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-9120(00)00161-2)
70. **Angelini A, Di Febbo C, Baccante G, Di Nisio M, Di Ilio C, Cuccurullo F, et al.** Identification of three genetic risk factors for venous thrombosis using a multiplex allele-specific PCR assay: Comparison of conventional and new alternative methods for the preparation of DNA from clinical samples. *J Thromb Thrombolysis*. 2003;16:189-93. <http://dx.doi.org/10.1023/B:THRO.0000024057.37588.2a>
71. **Koksal V, Baris I, Etlik O.** Primer-engineered multiplex PCR-RFLP for detection of MTHFR C677T, prothrombin G20210A and factor V Leiden mutations. *Exp Mol Pathol*. 2007;83:1-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2006.12.006>
72. **Dennis R, De Arboleda MN, Rodriguez MN, Salazar MS; Posada PS.** Estudio nacional sobre tromboembolismo venoso en población hospitalaria en Colombia: diferencias entre ciudades y especialidades. *Acta Med Colomb*. 1996;21:55-63.
73. **Hansson PO, Sörbo J, Eriksson H.** Recurrent venous thromboembolism after deep vein thrombosis. Incidence and risk factors. *Arch Intern Med*. 2000;160:769-74. <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.160.6.769>
74. **Camacho-Vanegas O, Giusti B, Restrepo-Fernandez CM, Abbate R, Pepe G.** Frequency of factor V (FV) Leiden and C677T methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in Colombians. *Thromb Haemost*. 1998;79:883-4.
75. **Yunis JJ, Camacho A, Murillo, L, Moreno R.** Resistencia a la proteína C activada (RPCA) y mutación del gen del

- factor V en pacientes con trombosis. Acta Med Colomb. 1998;23:223-33.
76. **Varela A, Bilbao A, García CF, Duarte M, Zerda R, Salazar M, Egea E.** Prevalencia de la mutación del factor V de la coagulación (factor V Leiden) en donantes de banco de sangre en cuatro ciudades colombianas. Acta Med Colomb. 2000;25:2-5.
77. **Bermúdez M, Briceño I, Gil F, Bernal J.** Homocisteína y polimorfismos de cistationina b sintasa y metilentetra-hidrofolato reductasa en población sana de Colombia. Colomb Médica. 2006;37:46-52.
78. **Torres JD, Cardona H, Alvarez L, Cardona-Maya W, Castaneda SA, Quintero-Rivera F, et al.** Inherited thrombophilia is associated with deep vein thrombosis in a Colombian population. Am J Hematol. 2006;81:933-7. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.20733>
79. **González-Galofre Z, Villegas, V, Martínez-Argüello M.** Determinación del polimorfismo C677T de metilentetra-hidrofolato reductasa (MTHFR) en una población de estudiantes de la Universidad del Rosario. Revista Ciencias de la Salud. 2010;8:7-21.