

Discusión conjunta

## DISCUSIÓN CONJUNTA

Los estudios realizados que se reflejan en esta tesis, han investigado diversos aspectos biológicos y clínicos relacionados con las anomalías hereditarias y adquiridas más relevantes que se han implicado en la trombofilia.

En primer lugar no se conocía si estas anomalías eran prevalentes en la población española y si tal prevalencia justificaba la realización de estudios biológicos de trombofilia. El primer gran estudio colaborativo realizado en nuestro país fue el estudio EMET. En él participaron 29 hospitales que aportaron datos clínicos y muestras de 2.154 pacientes consecutivos, no seleccionados, con tromboembolismo venoso en cualquier localización. Los únicos criterios de exclusión fueron la presencia de una hepatopatía conocida o de síndrome nefrótico. En todos los casos los diagnósticos se realizaron de manera objetiva. Se extrajeron muestras al cabo de 3-6 meses el evento tromboembólico sin influencia de anticoagulantes orales ni heparina, y las muestras de plasma citratado congelado se recibieron y analizaron en el centro coordinador. Allí se determinaron niveles de antitrombina, proteínas C y S, plasminógeno, fibrinógeno, cofactor II de la heparina, anticuerpos antifosfolípidos y anticoagulante lúpico. En el caso de alteraciones, se repitieron las determinaciones anómalas en una nueva muestra. Si esta era confirmatoria, el paciente era diagnosticado de la correspondiente alteración. Después se recabó información clínica y muestras de todos los parientes disponibles.

El 12,85 % presentaban deficiencia de alguna proteína. Era importante conocer estos datos porque los que aportaba la literatura eran muy discrepantes (entre el 4,5 y el 32,2 %), dependiendo de diferentes poblaciones o criterios de selección.<sup>71-80</sup>

Encontramos que la deficiencia de antitrombina es excepcional en nuestro medio (0,47 %) en pacientes no seleccionados con trombosis. En otras poblaciones se han encontrado frecuencias superiores al 5 %.<sup>78</sup> Este hallazgo pone en evidencia que la práctica habitual de evaluar la antitrombina en las mujeres que van a recibir anticonceptivos hormonales o tratamiento hormonal substitutivo no está justificada porque su prevalencia es muy baja en la población trombótica española.

La deficiencia de proteína C es igual de frecuente que en otros países en pacientes no seleccionados,<sup>23,75,79,80</sup> pero la prevalencia de proteína S, en especial de la deficiencia tipo III, era superior a la hallada en otros estudios. En el diagnóstico de la deficiencia de proteína S se tuvo en cuenta la edad y el sexo, porque en mujeres jóvenes es más baja que en el resto

de individuos.<sup>33</sup> Se ha propuesto la idea de que las deficiencias tipo I y tipo III son variantes fenotípicas de la misma enfermedad genética,<sup>32</sup> porque hay familias que poseen individuos con ambos fenotipos. Por otra parte, existen familias que sólo muestran la deficiencia tipo III, y en algunos casos se ha excluido que esto sea debido al gen estructural de la proteína S. Esto apoya la idea de que probablemente existan otros factores genéticos que modulen los niveles de proteína S y que expliquen la heterogeneidad de sus fenotipos. El papel de las deficiencias de plasminógeno y cofactor II de la heparina, que durante unos años fueron dos componentes de la hemostasia candidatos a ocasionar trombofilia, en la actualidad se cree que no poseen relevancia. En todo caso son alteraciones poco frecuentes, por lo que prácticamente no se considera su estudio en la trombofilia. Existen disfibrinogenemias implicadas en trombofilia. En este amplio estudio sólo se identificó un paciente con esta alteración. Aun así, debido a que la determinación de fibrinógeno es muy simple, se suele incluir en las evaluaciones de trombofilia.

Los anticuerpos antifosfolípidos en pacientes con tromboembolismo venoso son una anomalía prevalente (5,21%). En este grupo de pacientes no se encontró relación con presencia de enfermedades autoinmunes ni crónicas de otro tipo. En algunos casos se encontró asociado a otras deficiencias, pero la asociación era significativa sólo en el caso de la proteína S. Este hallazgo también había sido observado por otro grupo.<sup>81</sup> Una posible explicación es que los pacientes con más de una alteración puedan tener más riesgo de trombosis y, por tanto, estar más representados en las poblaciones estudiadas. Esto pasaría con cualquier asociación de deficiencias, pero al ser estas dos de las alteraciones más prevalentes, podrían observarse asociadas con mayor frecuencia.

Aunque la carencia de población control asintomática imposibilitaba el cálculo de los riesgos de trombosis asociados a cada alteración, sí que pudo estimarse el riesgo de presentar una deficiencia causante de trombofilia en función de parámetros clínicos como la historia familiar de trombosis, o si la trombosis era recurrente, juvenil o espontánea. Encontramos que el riesgo (la probabilidad) de encontrar una anomalía, aumentaba si se asociaban más de un factor. Esto pone de relieve la consideración de estos factores como marcadores clínicos de trombofilia.

Otro hallazgo interesante de este estudio fue que en el grupo de pacientes sin deficiencias, existía una asociación entre la historia trombótica familiar, la edad de la primera trombosis y las trombosis espontáneas. Esta asociación sugería que, probablemente existirían otras causas de trombofilia de origen genético, como se vería más adelante.

Las deficiencias de anticoagulantes naturales son de relevancia clínica no sólo para el paciente, sino también para los parientes asintomáticos que pueden ser portadores de la anomalía. El diagnóstico determina el tipo y duración del tratamiento y una más intensa profilaxis en futuras situaciones de riesgo. El conocimiento del riesgo trombótico puede ayudar a prevenir trombosis. La mayoría de las estimaciones del riesgo trombótico en lo referente a deficiencia de anticoagulantes naturales se han realizado en estudios retrospectivos no controlados, realizados en familias, que estiman el riesgo de una deficiencia concreta comparado con individuos sin deficiencias. En algunos estudios, puede existir un sesgo adicional, y es que las familias con tendencia a presentar trombosis por deficiencias conocidas pueden ser más proclives a participar en estudios y el riesgo puede sobrestimarse. En nuestro estudio, el reclutamiento fue prospectivo y el probando no sabía si está afecto de alguna anomalía en el momento de la inclusión.

Las estimaciones disponibles con relación al riesgo de trombosis en los pacientes deficientes en antitrombina, son escasas. Un análisis global de los datos de la literatura sitúan la mediana de la supervivencia libre de trombosis en los 27 años, que es muy similar a la encontrada por nosotros (30 años). Las otras deficiencias mostraban una mediana más tardía, 46 años para la deficiencia de proteína C, 48 años para la de proteína S tipo I y 61 para el tipo III. Además, se pudieron analizar familias en las que se combinaban 2 deficiencias de proteína C y S. En este caso, la presentación de la trombosis era más precoz. En cuanto al riesgo de trombosis, el más elevado se observó en los pacientes con deficiencia de antitrombina, después en los deficientes en proteína S tipo I seguidos de los afectados de déficit de proteína C y para acabar los de proteína S tipo III. En los pacientes con déficit de plaminógeno o cofactor-II de la heparina, no se observó incremento de riesgo. Otro hallazgo del estudio de las familias, aunque se adivinaba obvio, fue la constatación de manera fehaciente del hecho de que cuantos más familiares se analicen más probable es el diagnóstico de deficiencia familiar. En ocasiones los estudios familiares pueden originar reticencias en los parientes y que no acudan suficientes familiares. En estos casos el clínico debe insistir en la ayuda que supondrá el conocimiento del estado de portador en los individuos asintomáticos con la finalidad de aplicar la profilaxis más adecuada según las situaciones de riesgo que sobrevengan.

Posterior a la conclusión del estudio EMET, Dalhback et al identificaron una nueva alteración responsable de trombofilia, la resistencia a la proteína C activada. Los individuos afectados mostraban una pobre respuesta anticoagulante a la proteína C activada.<sup>35,36</sup> Después se pudo comprobar que en la mayoría de los casos se debía a la mutación factor V

Leiden.<sup>37,43</sup> Estudiamos este fenotipo en pacientes consecutivos referidos a nuestro centro y encontramos que los pacientes con resistencia a la PCa (RPCa) mostraban un incremento de riesgo de trombosis de más de 5 veces los controles. Además, se observó que los pacientes, independientemente de si portaban la mutación factor V Leiden o no, mostraban unas cifras de respuesta inferiores a los controles. Se pudo constatar una tendencia hacia una relación inversa entre las cifras de respuesta a la PCa y el riesgo de trombosis. Estos hallazgos se mantenían tras la exclusión de los pacientes con cifras de respuesta a la PCa patológicas (portadores de la mutación factor V Leiden, anticoagulantes lúpicos,...). Esto va a favor de que existan otros factores, probablemente genéticos, que determinen la variación de esta variable. Los tiempos de APTT fueron inferiores en los pacientes y estaban inversamente correlacionados con la edad, pero los ratios de APTT y de respuesta a la PCa se mostraron independientes. Una de las posibles explicaciones del porqué los ratios de APTT eran inferiores se ha podido constatar con posterioridad, ya que los pacientes con trombosis muestran cifras de factor VIII superiores.<sup>68,82</sup> Este factor es uno de los más influyentes en las determinaciones de APTT. La prevalencia de la resistencia a la PCa en nuestro medio, tras excluir pacientes con anticoagulante lúpico, se pudo establecer en un 12,8 %, y la del estado de portador de la mutación factor V Leiden en el 9,1 % (1,9% en controles). La medida de la resistencia a la PCa, además de ayudar en la detección de portadores de la mutación factor V Leiden, puede ser de utilidad para evaluar el riesgo de trombosis, ya que existe una correlación continua e inversa entre las cifras de RPCa y el riesgo trombótico.

Prácticamente a los 3 años del descubrimiento de la RPCa, Poort et al,<sup>48</sup> comunican el hallazgo de otro factor de riesgo, la mutación G20210A del gen de la protrombina. Tras analizar esta alteración en nuestros pacientes y controles nos encontramos con la anomalía genética más prevalente en nuestro medio (17,2%). En nuestra población control, era del 6,5%. Este polimorfismo produce un incremento del riesgo de trombosis de unas 3 veces.<sup>50</sup> Curiosamente en otra región española, se ha encontrado una menor prevalencia de esta mutación, tanto en pacientes como en controles, pero la mayor variabilidad del origen geográfico de nuestra población y la alta prevalencia en población control, es consistente con nuestros hallazgos de que es una frecuente causa genética de trombofilia. En estos pacientes se identificó con relativa frecuencia (26%) otra anomalía trombofílica. Una posible explicación es que los pacientes que combinan alteraciones tienen más riesgo de trombosis y más riesgo (probabilidad) de ser estudiados. Adicionalmente, el hecho de encontrar anomalías relativamente frecuentes, hace que aumente la probabilidad de encontrar pacientes con más de un defecto. También puede explicarse por un menor poder

trombofílico de esta mutación, que necesita la colaboración de otros factores genéticos y ambientales para que se exprese fenotípicamente. Uno de los factores ambientales más frecuentemente observados es la asociación de la mutación G20210A con la trombosis relacionada con los anticonceptivos hormonales, como ya se había demostrado previamente en el caso de la mutación factor V Leiden.

La asociación entre defectos trombofílicos y trombosis relacionada con anticonceptivos, la exploramos en un grupo de mujeres 325 mujeres en edad reproductora pertenecientes a 97 familias con trombofilia. En 1994, Pabinger y cols,<sup>83</sup> en un estudio retrospectivo demostraron que las mujeres con déficit de antitrombina mostraban un riesgo aumentado de trombosis, pero no las deficitarias en proteínas C o S. Unos años más tarde, en un estudio caso-control Bloemenkamp y cols encontraron una asociación entre el hecho de ser portadora de la mutación factor V Leiden y la trombosis venosa relacionada con anticonceptivos.<sup>84</sup> Otro grupo ha encontrado un riesgo incrementado de trombosis relacionada con anticonceptivos en mujeres con trombofilia, incluyendo las portadoras de la mutación G20210A del gen de la protrombina.<sup>85</sup>

Existen pocos trabajos en los que se ha analizado el efecto de factores ambientales en parientes afectos de anomalías trombofílicas.<sup>86-89</sup> Aunque no analizan la mutación de la protrombina G20210A, los resultados con relación a la trombosis asociada al uso de anticonceptivos son controvertidos. Martinelli y colaboradores encuentran un riesgo elevado de trombosis en portadores de deficiencia de antitrombina, proteína C, proteína S y portadores de la mutación factor V Leiden, pero cuando considera factores ambientales como el uso de anticonceptivos, no encuentra diferencias.<sup>86</sup> En cambio Simioni si que encuentra un riesgo más elevado si ingieren anticonceptivos, respecto a los familiares que no presentan anomalías.<sup>87</sup> De todos modos, como la práctica más habitual suele ser recomendar evitar estos fármacos en portadores de trombofilia, puede existir un sesgo por una menor prescripción en este grupo de pacientes. Así como la asociación del estado de portador de la mutación factor V Leiden y la trombosis relacionada con anticonceptivos parece bien establecida,<sup>89</sup> en el caso de la mutación de la protrombina G20210A, las cosas no son tan evidentes. En nuestro estudio hemos podido constatar que en las mujeres con trombofilia sin tener en cuenta la mutación de la protrombina G20210A, el uso de anticonceptivos por sí sólo no es un factor de riesgo determinante porque en esta población hay muchas mujeres que han sufrido trombosis por otras causas (idiopáticas, secundarias a otros factores). Estas anomalías serían suficientemente trombofílicas para que el papel de los anticonceptivos no fuera tan evidente. No sucede así en las pacientes con la mutación G20210A del gen de la

protrombina. En ellas, existía un incremento de riesgo de unas 3 veces de trombosis relacionada con anticonceptivos. Esto podría explicarse porque es una anomalía con repercusión débil y sería necesario el concurso de otros factores ambientales o genéticos, por ejemplo del uso de anticonceptivos, para que se manifieste clínicamente. Esta mutación y la mutación factor V Leiden son muy prevalentes en nuestro entorno por lo que en mujeres con antecedentes familiares de trombosis, debe considerarse la determinación de ambas mutaciones con anterioridad a la prescripción de anticonceptivos hormonales.

Debido a la trascendencia social de la utilización de estos fármacos en nuestra sociedad, numerosos trabajos han encaminado sus objetivos hacia la evaluación del riesgo de esta asociación y de la rentabilidad o viabilidad de realizar una criba sistemática de las anomalías protrombóticas en las mujeres que desean tomar anticonceptivos hormonales.

Como se ha dicho con anterioridad, tradicionalmente se determinaba la deficiencia de antitrombina en mujeres que iban a recibir anticonceptivos hormonales. Esta postura no tiene una justificación clara en nuestro medio, debido a que la prevalencia de esta deficiencia es extraordinariamente baja. Además, si tenemos en cuenta que es una deficiencia con una gran penetrancia clínica, es difícil que existan individuos afectos asintomáticos sin que exista una historia familiar de trombosis florida. Quizá el mismo razonamiento pueda extrapolarse a las deficiencias de proteína C o proteína S tipo I. Además, hay trabajos en los que no se observa un incremento de riesgo de trombosis relacionada con anticonceptivos.

En cuanto a la mutación factor V Leiden y la mutación G20210A de la protrombina, debido a la alta prevalencia que muestran en nuestro entorno, podría contemplarse la necesidad de realizar una criba sistemática en las pacientes que desean tomar anticonceptivos. En nuestra población, con una prevalencia de portadores de factor V Leiden del 2%, si tenemos en cuenta que para prevenir una muerte por causas tromboembólicas, hemos de contraindicar los anticonceptivos en 90.000 mujeres portadoras, hay que analizar 4.500.000 mujeres. Para prevenir una muerte, el gasto aproximado puede rondar los 135.000.000 € (casi 22.500 millones de pesetas). Para evitar un episodio trombótico, si asumimos que el 1% de los episodios tromboembólicos puede ser mortales, hemos de dividir las cifras por 100. Son unas cantidades sociosanitariamente poco admisibles.

En el caso de la mutación de la protrombina G20210A no existen datos equiparables. Probablemente se puede pensar que al ser más prevalente, es más rentable su detección en la población general, pero también se trata de una anomalía con menor poder trombofílico,

por lo que el número de mujeres que deberían estudiarse para prevenir una muerte, sería superior.

Una postura razonable sería realizar la determinación de ambas mutaciones en mujeres asintomáticas que van a recibir anticonceptivos o terapia hormonal substitutiva y que tienen antecedentes familiares de trombofilia. En el caso de pertenecer a familias con una deficiencia conocida, además es preciso determinar esa anomalía.

Otro factor adquirido importante relacionado con trombofilia es el cáncer. Esta asociación fue reconocida por Trousseau en el siglo XIX.<sup>90</sup> La trombosis es una complicación frecuente en los pacientes con neoplasias activas, en especial si están en progresión. Esto es debido a varios factores como: la liberación de sustancias procoagulantes a partir de las células tumorales, la inducción de la expresión de procoagulantes en las células no tumorales causada por sustancias tumorales o fármacos quimioterápicos, por el uso de accesos venoso centrales permanentes, por las habituales intervenciones quirúrgicas, encamamientos, compresiones venosas de origen tumoral, invasión vascular...<sup>91</sup> En estas situaciones, existen potentes factores adquiridos conocidos que justifican la trombofilia.

Posteriormente, varios estudios han puesto de manifiesto la relación entre la trombosis idiopática o recurrente en pacientes sin antecedentes de cáncer y la aparición de una neoplasia con posterioridad. Esto sería así porque en el momento del inicio de la trombosis, el tumor sería incipiente y no sería responsable de otros síntomas.<sup>92-94</sup> En consecuencia con estos hallazgos, numerosos estudios han evaluado la rentabilidad clínica de realizar un escrutinio extenso de la existencia de una neoplasia oculta (asintomática) en comparación con la realización de un seguimiento evolutivo. Los resultados han sido dispares.<sup>95</sup> Algunos autores proponen sólo la anamnesis y el examen físico, otros un escrutinio no extenso (añaden analítica estándar, CEA, LDH y radiografía simple de tórax) y por último, otros están a favor una investigación a fondo, incluyendo ecografía o tomografía computerizada de abdomen, gastroscopia y colonoscopia.<sup>95</sup> Otro aspecto relevante en este campo es la edad de presentación de la trombosis ya que se ha observado un incremento de la incidencia de cáncer en pacientes con trombosis idiopáticas mayores de 50 años. Algunos autores sugieren que la incidencia de cáncer tras trombosis venosa sólo es más alta a partir de los 50 años de edad.<sup>95</sup> Debido a que en los pacientes jóvenes las trombosis idiopáticas o recurrentes son frecuentemente debidas a trombofilia hereditaria, no está claro que estos pacientes deban someterse a un escrutinio extenso para buscar una neoplasia oculta. Es por este motivo que decidimos realizar un estudio en nuestros pacientes jóvenes con trombosis



acaecida antes de los 40 años para determinar la incidencia de neoplasia subsiguiente. En estos pacientes se realizó un escrutinio no extenso (anamnesis, exploración física, analítica estándar, LDH, CEA y radiografía simple de tórax) y una evaluación biológica de trombofilia que en ese momento incluía la determinación de antitrombina, proteína C, proteína S, resistencia a la proteína C activada, anticuerpos antifosfolípidos y anticoagulante lúpico. No encontramos ningún caso de neoplasia. La alteración más frecuente fue el hallazgo de alguna anomalía biológica. La historia trombótica familiar estaba presente con frecuencia. Estos hallazgos sugieren que en los pacientes jóvenes con trombosis venosa no está justificado el escrutinio de neoplasia oculta.

Por último, una frecuente alteración recientemente implicada en trombofilia venosa, es la hiperhomocisteinemia moderada. Se sabe desde hace tiempo que los pacientes con homocistinuria, una grave metabolopatía congénita ocasionada por la deficiencia homocigota de  $\beta$ -cistationina sintetasa, presentaban niveles muy elevados de homocisteína. Entre otras manifestaciones clínicas, estos pacientes presentan graves complicaciones trombóticas venosas y arteriales. En los últimos años se ha establecido que también los niveles moderadamente elevados de homocisteína en sangre son un factor de riesgo independiente de aterosclerosis y de enfermedades arteriales oclusivas en la población general.<sup>96,97</sup> Otros estudios sugieren la existencia de una asociación entre la enfermedad tromboembólica venosa con la hiperhomocisteinemia moderada, y que, además los pacientes tienen mayor tendencia a presentar trombosis recurrentes.<sup>60,98,99</sup> Nosotros encontramos que en nuestro medio la hiperhomocisteinemia moderada es una anomalía frecuente ya que afecta al 23% de los pacientes, mientras que sólo se encuentra en el 7% de los controles. Además de tener importancia en el diagnóstico biológico etiológico, tiene el valor añadido de ser un signo de otra enfermedad subyacente no conocida ya que las deficiencias de vitamina B<sub>12</sub> o de ácido fólico pueden ser la causa de la hiperhomocisteinemia. En estos casos el tratamiento de la hiperhomocisteinemia debe realizarse con la vitamina deficitaria. Por otra parte, los pacientes hiperhomocisteinémicos con vitamina B<sub>12</sub> y ácido fólico normales deben recibir tratamiento para intentar corregir la alteración. Inicialmente puede probarse con ácido fólico. Si no existe respuesta, puede añadirse vitamina B<sub>12</sub>, y si persisten los niveles elevados, vitamina B<sub>6</sub>. Lo que no está establecido es si estos tratamientos normalizadores de la hiperhomocisteinemia, son capaces de disminuir la tasa de recidivas, pero hay trabajos en curso que intentan obtener esta respuesta. De todos modos, debido a que es un factor independiente de aterotrombosis, el tratamiento corrector está plenamente justificado.

### **Consideraciones finales**

En estos trabajos se exploran prevalencias de factores biológicos de riesgo trombótico (factores trombofílicos) en la nuestra población. Un dato que se aprecia de inmediato, es que en la mayoría de los casos, no se identifican alteraciones responsables. Es decir, muchos pacientes que presentan una trombosis, permanecen sin que se conozcan las anomalías trombofílicas que les han llevado a presentar una trombosis a diferencia de otros individuos que se ven en situaciones similares. Es evidente que existen defectos aún no conocidos que deben explicar el porqué estos pacientes han desarrollado trombosis. Inicialmente, cuando las alteraciones conocidas afectaban a una proporción pequeña de la población, no era frecuente encontrar pacientes con defectos múltiples. Después de la identificación de alteraciones más frecuentes como las mutaciones factor V Leiden y mutación 20210A del gen de la protrombina, no es infrecuente encontrar individuos con más de un defecto causante de trombofilia.<sup>65</sup> Diversos trabajos apoyan la idea de que estos pacientes tienen un riesgo trombótico superior a los individuos con una sola alteración. De los estudios familiares, se sabe que no todos los individuos afectados desarrollan trombosis, que los individuos pueden permanecer asintomáticos hasta edades muy avanzadas. Hoy se considera que la trombofilia es una enfermedad que resulta de la interacción de factores genéticos, tanto deletéreos como protectores, con factores ambientales.<sup>100</sup> Es decir, la trombofilia es una enfermedad compleja, porque no sigue una herencia mendeliana clásica, el mismo genotipo puede dar lugar a distintos fenotipos, y diferentes genotipos pueden ocasionar un mismo fenotipo, y además existe la influencia ambiental.

Este concepto de enfermedad poligénica y multifactorial, hace que sean precisos nuevos métodos de investigación de nuevas causas o mecanismos de trombofilia. La trombofilia puede entenderse como la susceptibilidad a sufrir trombosis. Un individuo con factores de riesgo genéticos trombofílicos, a los que se unen unos factores ambientales fijos o variables (edad, paraplejía, ingesta de anticonceptivos,...), desarrolla la enfermedad (trombosis) cuando su susceptibilidad sobrepasa un determinado umbral. Para encontrar nuevos factores de riesgo genéticos, especialmente los que afectan a factores etiológicos que no estén en relación directa con componentes conocidos de la hemostasia, o bien que no causen deficiencias claras, existen dos estrategias, los estudios de asociación y los estudios de ligamiento genético.

En los estudios de asociación se busca una prevalencia diferente de un rasgo fenopítico o genotípico en la población de pacientes con respecto a la población de controles sanos. Si un marcador es más frecuente en los pacientes que en los controles, se puede

concluir que este marcador está implicado en la enfermedad o bien está tan próximo al responsable, que la probabilidad de recombinación es muy baja (está en desequilibrio de ligamiento). Los estudios de asociación tienen como limitaciones importantes el que fácilmente obtienen resultados falsamente positivos en especial en zonas de heterogeneidad genética (áreas multirraciales, países con inmigraciones frecuentes y abundantes...). Esto hace que, a menudo, los grupos puedan no ser genéticamente comparables y que resulte con proporciones de alelos que muestren diferencias significativas. Como consecuencia, pueden parecer relevantes hallazgos sin ninguna relación fisiopatológica con la enfermedad. Además, existe una gran influencia geográfica en los resultados y hacen que diferentes zonas sean poco comparables. Los polimorfismos que se analizan suelen elegirse de manera arbitraria y la información obtenida es a menudo parcial o equívoca. Por un lado, un resultado positivo no aporta información sobre el mecanismo causal porque no excluye que exista un desequilibrio de ligamiento con un polimorfismo cercano. Por otra parte, un resultado negativo no excluye que exista otro polimorfismo no explorado o desconocido en el mismo gen que sea responsable del fenotipo.

La mejor manera de establecer la influencia de un factor genético en una enfermedad es mediante análisis de ligamiento realizado en grupos de genealogías extensas. Para localizar zonas del genoma que influyan en un rasgo concreto, se examina la cosegregación del rasgo fenotípico (la enfermedad) y del marcador genético. Los estudios de ligamiento permiten la localización de genes no conocidos mediante el análisis de marcadores muy polimórficos distribuidos a lo largo del genoma (microsatélites). Permiten cuantificar la importancia de un factor genético en la expresión de la enfermedad, y pueden discriminar el desequilibrio de ligamiento como causa de una asociación entre un marcador genético y la enfermedad. Los análisis de ligamiento son más robustos y potentes que los de asociación.<sup>101</sup>

En la práctica, es más fácil obtener grupos de individuos no emparentados, en especial si se necesitan genealogías amplias, en la que existan varios individuos afectos. Es por ello que en la trombofilia casi todos los estudios realizados son de asociación.<sup>102</sup> Las causas de trombosis conocidas se han identificado, bien mediante el conocimiento de su implicación en vías importantes de la hemostasia (deficiencia de anticoagulantes naturales) o mediante estudios de asociación. Es estos casos, la replicación de los resultados en diversas cohortes de pacientes y controles (factor V Leiden, mutación PT20210A, hiperhomocisteinemia, anticuerpos antifosfolípidos,...) avala el papel de estas alteraciones en la trombofilia. El problema surge cuando, debido a la disponibilidad de las modernas técnicas más o menos mecanizadas de genotipado y la facilidad de analizar polimorfismos

relacionados o no con la hemostasia en grupos de pacientes numerosos, se obtienen resultados contradictorios o como mínimo sin ni si quiera intuir la posible relación etiopatogénica. En los últimos años, la literatura científica ha sufrido una auténtica avalancha de trabajos con resultados muy contradictorios.<sup>103</sup>

Aunque no puede descartarse que, al igual que ha sucedido con la mutación PT20210A, algún estudio basado en casos y controles sea capaz de identificar alguna alteración que aún no conocemos implicada en trombofilia, es evidente que el abordaje de la búsqueda de nuevas anomalías debe iniciarse mediante análisis de ligamiento en familias extensas. Es este tipo de estudios familiares el que previsiblemente arrojará luz sobre la importancia que mostrarán las diferentes variaciones del genoma en la susceptibilidad a diferentes enfermedades.<sup>104-107</sup> Concretamente, en nuestro centro estamos realizando un proyecto, el estudio GAIT (Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia), cuyos primeros resultados son prometedores y avalan esta línea. En este proyecto se ha podido establecer la heredabilidad de la susceptibilidad a la trombosis,<sup>107</sup> la heredabilidad de los fenotipos relacionados con la hemostasia<sup>104</sup> y algunos resultados preliminares que correlacionan genéticamente alguno de estos fenotipos con la susceptibilidad a padecer trombosis.<sup>107</sup>

## Conclusiones

## 1. Prevalencias de alteraciones implicadas en trombofilia en la población española:

- 1.1. Deficiencia de antitrombina: 0,47% (0,23-0,86; IC 95%).
- 1.2. Deficiencia de proteína C: 3,19% (2,48-4,02; IC 95%).
- 1.3. Deficiencia de proteína S: 7,27% (6,21-8,45; IC 95%).
  - 1.3.1. Deficiencia de proteína S tipo I: 1,59% (1,10-2,22; IC 95%).
  - 1.3.2. Deficiencia de proteína S tipo III: 5,68% (4,73-6,74; IC 95%).
- 1.4. Deficiencia de plasminógeno: 0,75% (0,43-1,21; IC 95%).
- 1.5. Deficiencia de cofactor-II de la heparina: 0,38% (0,17-0,74; IC 95%).
- 1.6. Disfibrinogenemia: 0,04% (un solo caso identificado).
- 1.7. Presencia de anticuerpos antifosfolípidos y anticoagulante lúpico: 4,08% (3,28-5,01; IC 95%).
- 1.8. Resistencia a la proteína C activada y mutación factor V Leiden: 12,8% (7,9-12,7; IC 95%) para la resistencia a la proteína C activada y 9,14 (5,4-14,2; IC 95%) para la mutación factor V Leiden.
- 1.9. Mutación G20210A del gen de la protrombina: 17,2% (10,4-21,1; IC 95%).
- 1.10. Hiperhomocisteinemia moderada: 23,4% (13,0-33,8; IC 95%).

## 2. Características clínicas relevantes en pacientes con trombofilia:

- 2.1. Edad de primera trombosis: El riesgo de encontrar una deficiencia es mayor en pacientes con edad inferior a los 45 años.
- 2.2. Trombosis recurrente: Los pacientes con trombosis recurrentes tienen más deficiencias.
- 2.3. Historia trombótica familiar: Los antecedentes familiares de trombosis aumentan la probabilidad de encontrar una deficiencia.
- 2.4. Trombosis espontánea: En pacientes con trombosis espontánea es más probable encontrar deficiencias.
- 2.5. Localización de las trombosis: Aunque tradicionalmente las localizaciones inusuales son un signo que hace sospechar la trombofilia, debido a los pocos

casos encontrados en nuestros estudios, no hemos podido establecer el riesgo de encontrar una deficiencia.

2.6. La combinación de diversos factores clínicos aumenta de manera notable la probabilidad de encontrar una deficiencia.

### **3. Indicaciones y composición del escrutinio de trombofilia.**

Tras considerar todos los resultados, en la actualidad se recomienda la realización de un escrutinio de trombofilia en todos los pacientes que presenten un episodio de tromboembolismo venoso en edad joven, con antecedentes de trombosis recurrente, con trombosis idiopática o con presencia de antecedentes familiares trombóticos. Las determinaciones a realizar serán las siguientes: antitrombina, proteína C, proteína S total y libre, resistencia a la proteína C activada, las mutaciones factor V Leiden y G20210A del gen de la protrombina, los anticuerpos antifosfolípidos y la homocisteína.

### **4. Riesgo de trombosis en los portadores asintomáticos.**

Del estudio de los familiares se estima que la supervivencia libre de trombosis está acortada en los individuos afectos. El riesgo de trombosis en los familiares afectos es de 8,1 veces para el déficit de proteína S tipo III, 12,6 para el déficit de proteína C, casi 20 para el déficit de proteína S tipo I y 21,2 para el déficit de antitrombina. Los individuos afectos de déficit de plasminógeno o cofactor-II de la heparina no presentaban incremento de riesgo.

### **5. Necesidad de identificación de familiares afectos.**

Debido a que muchas de estas anomalías son hereditarias y conllevan un riesgo de trombosis, es recomendable el estudio de todos los familiares disponibles con el fin de identificar familiares afectos. Esto es útil para estos

individuos ya que se pueden optimizar las pautas profilácticas en situaciones de riesgo futuras.

#### **6. Indicación del escrutinio de trombofilia en mujeres que desean tomar anticonceptivos.**

En mujeres que desean tomar anticonceptivos hormonales no está indicado realizar escrutinio de trombofilia con la excepción de que pertenezcan a familias en las que existan antecedentes de trombosis. En estos casos se recomienda la detección del estado de portador del factor V Leiden y de la mutación G20210A del gen de la protrombina ya que su prevalencia es alta y se ha demostrado que ambas potencian el poder trombofílico de los anticonceptivos hormonales.

#### **7. Necesidad de búsqueda de neoplasia oculta en pacientes jóvenes con trombosis venosa.**

Aunque de manera general, tras un primer episodio de tromboembolismo venoso idiopático o recurrente, es preciso buscar una neoplasia oculta subyacente, esta estrategia no está justificada en pacientes jóvenes, ya que la etiología más frecuente es la trombofilia.

#### **8. Búsqueda de nuevos factores genéticos causantes de trombofilia.**

El hecho de que en los pacientes sin alteraciones biológicas exista una asociación entre la historia familiar positiva, la edad de la primera trombosis y la trombosis recurrente hace pensar que existan otros factores genéticos relacionados con trombofilia. Este hallazgo garantiza la realización de estudios con el fin de localizar estos factores.



## Bibliografía

## Bibliografía

1. Hirsh J, Colman WC, Marder VJ, George JN, Clowes AW. Overview of thrombosis and its treatment. En: Colman WC, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 4ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001; 1071-84.
2. Baumgartner HR. The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition and formation of mural thrombi. *Microvasc Res* 1973; 5: 167-79.
3. Colen D. On the regulation and control of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1980; 43: 77-89.
4. Plow EF, Edgington TS. An alternative pathway of fibrinolysis. I. The cleavage of fibrinogen by leukocyte proteases at physiologic pH. *J Clin Invest* 1975; 56: 30-8.
5. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 1998; 91: 3527-61.
6. Ogawa S, Gerlach H, Esposito C, Pasagian-Macaulay A, Brett J, Stern D. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties. *J Clin Invest* 1990; 85: 1090-8.
7. Cines DB, Tomaski A, Tannenbaum S. Immune endothelial-cell injury in heparin-associated thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1987; 316: 581-9.
8. Libby P, Simon DI. Thrombosis and atherosclerosis. En: Colman WC, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 4ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001; 743-753.
9. George JN, Colman RW. Overview of platelet structure and function. En: Colman WC, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 4ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001; 381-6.
10. Furie B, Furie BC. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med* 1992; 326: 800-6.

11. Esmon CT. Proteína C, protein S and thrombomodulin. En: Colman WC, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 4ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001; 335-54.
12. Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 26486-91.
13. van Boven HH, Lane D. Antithrombin and its inherited deficiency states. *Semin Hematol* 1997; 34: 188-204.
14. Petersen LC, Valentin S, Hedner U. Regulation of the extrinsic pathway system in healthy and disease: the role of factor VIIa and tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Res* 1995; 79: 1-47.
15. Nesheim M, Wei W, Boffa M, Nagashima M, Morser J, Bajzar L. Thrombin, Thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis *Thromb Haemost* 1997; 78: 386-91.
16. Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood* 1987; 69: 460-6.
17. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965; 13; 516.
18. Tait RC, Walker ID, Perry DJ, Islam SI, Daly ME, McCall F, Conkie JA, Carrell RW. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. *Br J Haematol* 1994; 87:106-12.
19. Demers C, Ginsberg JS, Hirsh J, Henderson P, Blajchman MA. Thrombosis in antithrombin-III-deficient persons. Report of a large kindred and literature review. *Ann Intern Med* 1992; 116: 754-61.
20. Montagud M, Montserrat I, Oliver A, Adelantado JM, Mateo J, Borrell M, Fontcuberta J. Embarazo y trombofilia en mujeres con deficiencias congénitas de antitrombina III, proteína C, proteína S o plasminógeno: análisis de 39 casos. *Med Clin (Barc)* 1993;100: 201-4.
21. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman T, Kleiss A, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; 68: 1370-3.

22. Allaart CF, Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM, Briët E. Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency defect. *Lancet* 1993; 341: 134-8.
23. Koster T, Rosendaal FR, Briët E, van der Meer FJM, Colly LP, Trienekens PH, Poort SR, Reitsma PH, Vandenbroucke JP. 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.
24. Miletich J, Sherman L, Broze G Jr. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 1987; 317: 991-6.
25. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, Islam SI, McCall F, Poort SR, Conkie JA, Bertina RM. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* 1995; 73:87-93.
26. Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, Gandrille S, Greengard JS, Ireland H, Krawczak M, Lind B, Long GL, Poort SR, 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. *Thromb Haemost*. 1995; 73: 876-89.
27. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1984; 74: 2082-8.
28. Engesser L, Broekmans AW, Briët E, Brommer EJP, Bertina RM. Hereditary protein S deficiency: clinical manifestations. *Ann Intern Med* 1987; 106: 677-82.
29. Koppelman SJ, Hackeng TM, Sixma JJ, Bouma BN. Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII. *Blood*. 1995; 86: 1062-71.
30. Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 1984; 64:1297-300.
31. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1984; 74: 2082-8.

32. Zoller B, Garcia de Frutos P, Dahlback B. Evaluation of the relationship between protein S and C4b-binding protein isoforms in hereditary protein S deficiency demonstrating type I and type III deficiencies to be phenotypic variants of the same genetic disease. *Blood* 1995; 85: 3524-31.
33. Gari M, Falkon L, Urrutia T, Vallve C, Borrell M, Fontcuberta J. The influence of low protein S plasma levels in young women, on the definition of normal range. *Thromb Res* 1994; 73: 149-52.
34. D'Angelo A, Della Valle P, Crippa L, Pattarini E, Grimaldi LM, Vigano D'Angelo S. Brief report: autoimmune protein S deficiency in a boy with severe thromboembolic disease. *N Engl J Med* 1993; 328:1753-7.
35. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by a poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1004-8.
36. Svensson PJ, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 330: 517-22.
37. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-5.
38. Faioni EM, Franchi F, Asti D, Sacchi E, Bernardi F, Mannucci PM. Resistance to activated protein C in nine thrombophilic families: interference in a protein S functional assay. *Thromb Haemost.* 1993; 70: 1067-71.
39. Tirado I, Mateo J, Oliver A, Borrell M, Souto JC, Fontcuberta J. Patients with venous thromboembolism have a lower APC response than controls. Should this be regarded as a continuous risk factor for venous thrombosis? *Haematologica* 1999; 84: 470-2.
40. Cox MJ, Rees DC, Martinson JJ, Clegg JB. Evidence for a single origin of factor V Leiden. *Br J Haematol* 1996; 92: 1022-5.
41. Zivelin A, Griffin JH, Xu X, Pabinger I, Samama M, Conard J, Brenner B, Eldor A, Seligsohn U. A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood.* 1997; 89: 397-402.

42. Lindqvist PG, Svensson PJ, Dahlback B, Marsal K. Factor V Q506 mutation (activated protein C resistance) associated with reduced intrapartum blood loss--a possible evolutionary selection mechanism. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 69-73.
43. 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.
44. 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.
45. Ryan DH, Crowther MA, Ginsberg JS, Francis CW. Relation of factor V Leiden genotype to risk for acute deep venous thrombosis after joint replacement surgery. *Ann Intern Med* 1998; 128: 270-6.
46. 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* 1997; 90: 1552-7.
47. 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.
48. 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.
49. Soria JM, Almasy L, Souto JC, Tirado I, Borell M, Mateo J, Slifer S, Stone W, Blangero J, Fontcuberta J. Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. *Blood* 2000; 95: 2780-5.
50. Vicente V, Gonzalez-Conejero R, Rivera J, Corral J. The prothrombin gene variant 20210A in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica* 1999; 84: 356-62.
51. Souto JC, Mateo J, Soria JM, Llobet D, Coll I, Borrell M, Fontcuberta J. Homozygotes for prothrombin gene 20210 A allele in a thrombophilic family without clinical manifestations of venous thromboembolism. *Haematologica* 1999; 84:627-32.

- 
52. Souto JC, Coll I, Llobet D, del Río E, Oliver A, Mateo J, Borrell M, Fontcuberta. The Prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thromb Haemost* 1998; 80: 366-9.
  53. 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* 1998; 338: 1793-7.
  54. Santamaria A, Mateo J, Oliver A, Menendez 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* 2001; 86: 965-71.
  55. Andersson TR, Larsen ML, Handeland GF, Abildgaard U. Heparin cofactor II activity in plasma: application of an automated assay method to the study of a normal adult population. *Scand J Haematol* 1986; 36: 96-102.
  56. Massouh M, Jatou A, Gordon EM, Ratnoff OD. Heparin cofactor II activity in plasma during pregnancy and oral contraceptive use. *J Lab Clin Med* 1989; 114: 697-9.
  57. McDonagh. Dysfibrinogenemia and other disorders of fibrinogen structure and function. En: Colman WC, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001; 855-92.
  58. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* 1996; 87: 3531-44.
  59. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, Atherosclerosis and Thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 81: 165- 76.
  60. den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 759-62.

61. Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism. Results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study). *Thromb Haemost* 1997; 77: 444-51.
62. Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J, and the EMET Group. 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 Coag Fibrinol* 1998; 9: 71-8.
63. Koeleman BP, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C-deficient families. *Blood* 1994;84:1031-5.
64. Zöller B, Berntsdotter A, García de Frutos P, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood* 1995; 85: 3518-23.
65. 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* 2001; 86: 1200-8.
66. Ohlin AK, Norlund L, Marlar RA. Thrombomodulin gene variations and thromboembolic disease. *Thromb Haemost* 1997; 78: 396-400.
67. Llobet D, Falkon L, Mateo J, Vallvé C, Martínez E, Fontcuberta J, Borrell M. Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in two out of three members of a family with thrombophilia. *Thromb Res* 1995; 80: 413-8.
68. Kamphuisen PW, Eikenboom JC, Vos HL, Pablo R, Sturk A, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased levels of factor VIII and fibrinogen in patients with venous thrombosis are not caused by acute phase reactions. *Thromb Haemost* 1999; 81: 680-3.
69. Meijers JCM, Tekelenburg WLH, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med* 2000; 342: 696-701.
70. van Hylckama Vlieg A, van der Linden IK, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 2000; 95: 3678-82.



71. Briët E, Engesser L, Brommer EJP, Broekmans AW, Bertina RM. Thrombophilia: its causes and a rough estimate of its prevalence [abstract]. *Thromb Haemostas* 1987; 58: 39.
72. Gladson CL, Scharrer I, Hach V, Beck KH, Griffin JH. The frequency of type I heterozygous protein S and protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis. *Thromb Haemostas* 1988; 59: 18-22.
73. Ben-Tal O, Zivelin A, Seligsohn U. The relative frequency of hereditary thrombotic disorders among 107 patients with thrombophilia in Israel. *Thromb Haemostas* 1990; 61: 50-4.
74. Engesser L, Brommer EJP, Kluft C, Briët E. Elevated plasminogen activator inhibitor (PAI), a cause of thrombophilia?. A study in 203 patients with familial or sporadic thrombophilia. *Thromb Haemostas* 1989; 62: 673-80.
75. Heijboer H, Brandjes DPM, Büller HR, Sturk A, ten Cate LW. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1990;323:1512-6.
76. Taberero MD, Tomás JF, Alberca I, Orfao A, López-Borrascas A, Vicente V. Incidence and clinical characteristics of hereditary disorders associated with venous thrombosis. *Am J Hematol* 1991; 36: 249-54.
77. Bick RL, Jakway J, Baker WF. Deep vein thrombosis: prevalence of etiologic factors and results of management in 100 consecutive patients. *Semin Thromb Hemost* 1992; 18: 267-74.
78. Melissari E, Monte G, Lindo VS, Pemberton KD, Wilson NV, Edmondson R, Das S, Kakkar VV. Congenital thrombophilia among patients with venous thromboembolism. *Blood Coagul Fibrinol* 1992; 3: 749-58.
79. Malm J, Laurell M, Nilsson IM, Dahlbäck B. Thromboembolic disease. Critical evaluation of laboratory investigation. *Thromb Haemost* 1992; 68: 7-13.
80. Pabinger I, Brücker S, Kyrle PA, Schneider B, Korninger HC, Niessner H, Lechner K. Hereditary deficiency of antithrombin III, protein C and protein S: prevalence in patients with a history of venous thrombosis and criteria for rational patient screening. *Blood Coagul Fibrinol* 1992;3:547-53.

81. Forastiero RR, Kordich L, Basilotta, Carreras LO. Differences in protein S and C4b-binding protein levels in different groups of patients with antiphospholipid antibodies. *Blood Coagul Fibrinol* 1994;5: 609-16.
82. Rosendaal FR. High levels of factor VIII and venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2000; 83: 1-2.
83. Pabinger I, Schneider B. Thrombotic risk of women with hereditary antithrombin III, protein C and protein S deficiency taking oral contraceptive medication. The GTH Study Group on Natural Inhibitors. *Thromb Haemost* 1994; 71: 548-52.
84. Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Büller HR, Vandenbroucke JP. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet* 1995; 346: 1593-6.
85. 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* 2000; 342: 374-80.
86. Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, et al. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: A study of 150 families. *Blood* 1998; 92: 2353-8.
87. Simioni P, Sanson BJ, Prandoni P, et al. Incidence of venous thromboembolism in families with inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* 1999; 81:198-202.
88. Middeldorp S, Henkens CM, Koopman MM, et al. The incidence of venous thromboembolism in family members of patients with factor V Leiden mutation and venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1998; 128: 15-20.
89. Lensen RP, Bertina RM, de Ronde H, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Venous thrombotic risk in family members of unselected individuals with factor V Leiden. *Thromb Haemost* 2000;83:817-21.
90. Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. In: *Clinique Medicale de l'Hotel-Dieu de Paris*. 2nd ed. Vol. 3. Paris: JB Baillières; 1865; 654–712.
91. Prandoni P, Piccioli A, Girolami A. Cancer and venous thromboembolism: an overview. *Haematologica*. 1999; 84: 437-45.

- 
92. Goldberg RJ, Seneff M, Gore JM, Anderson FA, Greene HL, Wheeler HB, Dalen JE. Occult malignant neoplasm in patients with deep venous thrombosis. *Arch Intern Med* 1987; 147: 251–3.
  93. Nordström M, Lindblad B, Anderson H, Bergqvist D, Kjellstöm T. Deep venous thrombosis and occult malignancy: an epidemiological study. *Br Med J* 1994; 308: 891–4.
  94. Gore JM, Appelbaum JS, Greene HL, Dexter L, Dalen LE. Occult cancer in patients with acute pulmonary embolism. *Ann Intern Med* 1982; 96: 556–60.
  95. Monreal M, Prandoni P. Venous thromboembolism as first manifestation of cancer. *Semin Thromb Hemost.* 1999; 25: 131-6.
  96. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274:1049-57.
  97. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Program. *JAMA* 1997; 277:1775-81.
  98. Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, Miletich JP, Malinow MR, Stampfer MJ. Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation* 1997; 95: 1777-82.
  99. D'Angelo A, Mazzola G, Crippa L, Fermo I, Viganò D'Angelo S. Hyperhomocysteinemia and thromboembolic disease. *Haematologica* 1997; 82: 211-9.
  100. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353: 1167–73.
  101. Weiss KM. Genetic variation and human disease. Principles and evolutionary approaches. Cambridge University Press. Cambridge 1993.
  102. Scott BT, Bovill EG, Callas PW, Hasstedt SJ, Leppert MF, Valliere JE, Varvil TS, Long GL. Genetic screening of candidate genes for a prothrombotic interaction with type I protein C deficiency in a large kindred. *Thromb Haemost* 2001; 85: 82-7.
  103. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 2000; 95: 1517-32.

- 
104. Souto JC, Almasy L, Borrell M, Gari M, Martinez E, Mateo J, Stone WH, Blangero J, Fontcuberta J. Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families. *Circulation* 2000; 101: 1546-51.
  105. Souto JC, Almasy L, Muniz-Diaz E, Soria JM, Borrell M, Bayen L, Mateo J, Madoz P, Stone W, Blangero J, Fontcuberta J. Functional effects of the ABO locus polymorphism on plasma levels of von Willebrand factor, factor VIII, and activated partial thromboplastin time. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2024-8.
  106. Souto JC, Almasy L, Blangero J, Stone W, Borrell M, Urrutia T, Mateo J, Fontcuberta J. Genetic regulation of plasma levels of vitamin K-dependent proteins involved in hemostasis: results from the GAIT Project. *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia. Thromb Haemost* 2001; 85: 88-92.
  107. Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, Coll I, Felices R, Stone W, Fontcuberta J, Blangero J. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia. Am J Hum Genet* 2000; 67: 1452-9.