

Diagnóstico en México de alteraciones moleculares de la hemostasia

Carlos Martínez-Murillo,^{a,b*} Christian Ramos-Peñañiel^a y Juan Collazo-Jaloma^a

^aServicio de Hematología del Hospital General de México, SSA, México D. F., México

^bDirección de Prestaciones Médicas, Coordinación de UMAE, IMSS, México D. F., México

RESUMEN

La hemostasia representa el cese fisiológico de la hemorragia por medio de un mecanismo complejo que involucra un cambio de estado físico de líquido a sólido, con la formación de fibrina y el enlace del coágulo en una malla insoluble. Las propiedades de la coagulación sanguínea requieren que los componentes de las reacciones sean de una manera localizada, amplificada y modulada.

Las alteraciones en el sistema de la hemostasia tienen la traducción clínica de hemorragias y trombosis, esto ocurre cuando existe una pérdida de la homeostasis.

La evolución dinámica en el conocimiento de los mecanismos de hemostasia, así como el mayor entendimiento de los factores etiopatogénicos de las enfermedades hemorrágicas y trombóticas, han permitido mejorar los diagnósticos y tratamientos de dichos defectos. La habilidad para poder ampliar el DNA mediante la reacción de cadena de polimerasa (PCR), ha revolucionado la capacidad para la detección de las mutaciones genéticas. El análisis molecular de las familias con hemofilia al igual que otras alteraciones hereditarias de la coagulación, actualmente ya es una práctica común, en especial en el área de investigación. Se han identificado hasta el momento 900 mutaciones que implican el sitio donde se codifica el FVIII.

Los trastornos trombofílicos debido a mutaciones genéticas pueden ser clasificados en dos grandes categorías: (1) pérdida de la función de mutaciones, como las que causan las deficiencias de anticoagulantes naturales de las proteínas; antitrombina (AT), proteína C (PC) y proteína S (PS), y (2) mutaciones que ocasionan incremento en la función de proteínas procoagulantes incluidas; factor V Leiden y la mutación G20210A de la protrombina. Estas dos categorías de mutaciones difieren sustancialmente con respecto a su origen evolutivo, efectos genéticos, incidencia, impacto funcional, y los métodos de detección.

Palabras clave:

Coagulación, trombosis, trombofilia, enfermedades hemorrágicas, hemofilia, enfermedad de von Willebrand

SUMMARY

Hemostasis is the physiological cessation of bleeding through a complex mechanism that involves changing of blood from a fluid to a solid state with the formation of fibrin and the uniting of the clot in an insoluble mesh. Blood clotting properties require that the components of the reactions be localized, amplified and modulated. Changes in hemostasis are the translation of clinical bleeding and thrombosis, which occurs when there is a loss of homeostasis. The dynamic evolution in the understanding of the mechanisms of hemostasis, as well as greater understanding of the etiopathogenic factors of bleeding and thrombotic disease, have improved the diagnosis and treatment of such defects. The ability to extend the DNA by polymerase chain reaction has revolutionized the ability to detect genetic mutations. Molecular analysis of families with hemophilia as well as other hereditary coagulation disorders is already a common practice especially in the area of research. There have been 900 mutations identified so far that involve the location where FVIII is coded. Thrombophilic disorders due to genetic mutations can be classified into two broad categories: 1) loss of the function of mutations such as those that cause natural anticoagulant deficiencies of proteins, antithrombin, protein C and protein S and 2) mutations that cause increases in procoagulant protein function and include factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation. These two mutation categories differ significantly with respect to its evolutionary origin, genetic effects, incidence, functional impact, and detection methods.

Key words:

Coagulation, thrombosis, thrombophilia, hemorrhagic diseases, hemophilia, von Willebrand disease

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Carlos Martínez-Murillo. Hospital General de México, Servicio de Hematología. Dr. Balmis 248, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, 06725 México D. F., México. Tel: (55) 9198 4570. Correo electrónico: carlmarz@prodigy.net.mx

Introducción

La hemostasia es un sistema biológico de defensa donde participan elementos celulares y plasmáticos con el objetivo de detener la hemorragia en caso de lesión vascular. Este sistema se mantiene en equilibrio por efecto de sustancias protrombóticas y antitrombóticas para mantener la sangre en estado líquido dentro de los vasos.

Cuando el sistema de la hemostasia funciona adecuadamente las funciones de interacción entre vaso sanguíneo, plaquetas y factores de coagulación se autorregulan y permiten que se lleve una interacción dinámica entre el tejido hematopoyético y los demás órganos y sistemas del organismo.^{1,2}

Las alteraciones en el sistema de la hemostasia tienen la traducción clínica de hemorragias y trombosis, esto ocurre cuando existe una pérdida de la homeostasis.

La evolución dinámica en el conocimiento de los mecanismos de hemostasia, así como el mayor entendimiento de los factores etiopatogénicos de las enfermedades hemorrágicas y trombóticas, han permitido mejorar los diagnósticos y tratamientos de dichos defectos.^{3,4}

Diagnóstico molecular de enfermedades hemorrágicas

Una enfermedad que por décadas ha entusiasmado a los científicos a efectuar investigaciones más extensas fue la hemofilia, conocida como enfermedad de reyes. El conocimiento de esta enfermedad que se caracteriza por defectos cuantitativos de los factores de coagulación VIII, IX, aportó información valiosa en el conocimiento de la fisiología de la coagulación. Además constituye un buen modelo para estudiar el adelanto en técnicas moleculares para identificar los defectos de la enfermedad.

La hemofilia es la alteración hemorrágica hereditaria más frecuente. Ésta se diagnostica por alteraciones en el tiempo de tromboplastina parcial activada y una disminución en los niveles de factor VIII o IX en el plasma. La hemofilia es una alteración ligada al cromosoma X, causada por una mutación en el gen del factor VIII (FVIII). El FVIII se codifica en la parte distal del brazo largo del cromosoma X (Xq28). Consiste en 26 exones y codifica una proteína de 2332 aminoácidos. La secuencia del FVIII fue publicada por primera vez en 1984, con las técnicas actuales es posible la identificación de las alteraciones en la mayor parte de los pacientes con hemofilia A. Debido a la heterogeneidad de la enfermedad, el diagnóstico prenatal es complicado.⁵ La habilidad para poder ampliar el DNA mediante la reacción de cadena de polimerasa (PCR), ha revolucionado la capacidad para la detección de las mutaciones genéticas.⁶ El análisis molecular de las familias con hemofilia al igual que otras alteraciones hereditarias de la coagulación, actualmente ya es una práctica común en especial en el área de investigación.^{7,8} Se han identificado hasta el momento 900 mutaciones que implican el sitio en donde se codifica el FVIII. Nuevas técnicas como el uso del Análisis de Fusión de Alta Resolución, HRM por sus siglas en inglés (*high resolution melting analysis*) al igual que el PCR multiplex, se han utilizado en algunas series para detectar las

mutaciones en el gen FVIII. La sensibilidad de este primero se ha establecido en 93%.⁹⁻¹¹ La mutación más frecuente en el F8C es en el intron 22 y las inversiones que ocurren en aproximadamente 50 y 5% de los pacientes con hemofilia severa respectivamente.¹² El resto de las alteraciones son mutaciones puntuales, pequeñas inserciones/deleciones. Las mutaciones se han asociado con un riesgo mayor de presentar inhibidor. El espectro de mutaciones es mediado por las recombinaciones intracromosomales, en los pacientes con hemofilia leve o moderada las principales alteraciones son mutaciones puntuales las cuales se presentan de novo en un tercio de los casos. La detección de mujeres portadoras y el diagnóstico prenatal son medidas que se han implementado en el estudio de diversas familias con hemofilia.¹¹ La identificación de diversas mutaciones en las vellosidades coriónicas de productos de 10-12 semanas de gestación ha permitido la mejoría del diagnóstico prenatal.¹³⁻¹⁵

Deleciones: la presencia de deleciones se ha asociado a una mayor incidencia de inhibidor (68.8%) en comparación a aquellas con otros tipos de mutaciones (30-40%). Green y cols. en el Reino Unido evaluaron las alteraciones en pacientes con hemofilia, se registraron 11 deleciones principales.¹⁰

Inversiones: se ha registrado que alrededor de 50% de los pacientes con hemofilia severa cuenta con inversiones en el gen del FVIII. La inversión es el resultado de una recombinación entre el gen localizado en el intron 22 del FVIII y uno de los 2 genes A distales. Las inversiones pueden detectarse por medio de Southern Blot y técnicas de hibridación *in vitro*.¹⁵ La mayoría de las inversiones encontradas por Deutz-Terlouw y cols. fueron localizadas en la parte distal del gen A (85%) y sólo en 15% se localizó en una región proximal.¹⁶ En población China, Chen y cols. registraron las inversiones en el intron 22 como la manifestación genética más frecuente y principalmente se ve afectada la región distal del gen A (91.4%).¹⁷ Gau y cols. mediante el análisis por RT-PCR, encontraron que la inversión en el intron 22 fue detectada en 7 de 20 pacientes con hemofilia A severa (35%) siendo la manifestación más frecuente en la variedad severa.¹⁸

Mutaciones puntuales: el principal defecto en los pacientes con hemofilia son las inversiones, las mutaciones puntuales y las pequeñas deleciones/inserciones son responsables de la mayoría de los casos en los pacientes con hemofilia moderada y leve. La mayor parte de estas mutaciones son exclusivas, algunas ya descritas por diversos autores (V162M, R527W, R1966X, R2159C) y otras descritas de forma reciente (E204N, E265X, M320T, F436C).¹⁹

Diagnóstico molecular de enfermedades trombóticas

Trombofilia es un término correcto que incluye varias entidades que se han descrito como situaciones de hipercoagulabilidad o estados pretrombóticos.

Las trombofilias no tienen un origen único que pueda explicar por completo el fenómeno, más bien son de origen multigénico, es decir, donde confluyen diversos factores hereditarios y adquiridos.^{20,21}

En realidad las trombofilias son defectos complejos donde se ven involucrados múltiples mecanismos que fisiológicamente

interactúan para mantener la sangre fluida dentro de los vasos, pero que en estados donde confluyen diversas condiciones o factores, se alteran y provocan trombosis.^{22,23}

Los trastornos trombofílicos, debidos a mutaciones genéticas, pueden ser clasificados en dos grandes categorías: (1) pérdida de la función de mutaciones, como las que causan las deficiencias de anticoagulantes naturales de las proteínas; antitrombina (AT), proteína C (PC) y proteína S (PS); y (2) mutaciones que ocasionan incremento en la función de proteínas procoagulantes incluidas factor V Leiden y la mutación G20210A de la protrombina.^{24,25}

Estas dos categorías de mutaciones difieren sustancialmente con respecto a su origen evolutivo, efectos genéticos, incidencia, impacto funcional, y los métodos de detección. Dentro del primer grupo, numerosas mutaciones puntuales se han descrito. Por lo tanto, dentro de cada uno de estos genes de AT, PC, PS existen de decenas a cientos de mutaciones que resultan en inactivación parcial o completa de un gen específico.^{26,27} Es decir, que parecen haber surgido como múltiples eventos genéticos separados entre todas las poblaciones, de manera que cada mutación suele confinarse a una familia o región (Cuadro I).

En contraste, se cree que las mutaciones que incrementan la función tienen un origen evolutivo ancestral, debido a que sólo aparecen en un sitio de los genes respectivos.^{28,29}

Resistencia a la Proteína C Activada (RPCa). La RPCa constituye un defecto autosómico dominante, debido a una mutación en el gen que codifica para el FV. Desde su descripción en 1993,³⁰ se han publicado infinidad de artículos sobre el tema, esto debido a que constituye el defecto hereditario más frecuentemente informado con aproximadamente 40 a 50% de los casos de trombosis y en población caucásica de 7%.

El descubrimiento por Dahlbäck^{31,32} de esta nueva alteración molecular, se hizo al estar realizando ensayos con PC activada (PCa) en plasmas de pacientes con trombofilia no explicada. Dahlbäck se percató que la PCa era incapaz de prolongar *in vitro* el valor del tiempo de la tromboplastina parcial activada (TTPa) como habría de esperarse; es decir, su plasma era "resistente" a la acción de la PCa. Se introdujo entonces el concepto de resistencia a la proteína C activada (RPCa). Este defecto se encontró en varios miembros de una familia con historia de trombofilia.³³ Posteriormente, Griffin y cols. encontraron que 50% de los pacientes trombofílicos presentaban la RPCa.³³

En 1994 Bertina y cols.³⁴ en Leiden, Holanda, demostraron que el fenotipo de la RPCa está asociado a la homo o heterocigosidad de la mutación en el punto del exón 10 del gen del factor V, en el que la sustitución de un nucleótido G por A en la posición 1691 produce la síntesis de una molécula anómala del factor V. Esta mutación, llamada mutación Leiden del FV (R-506-Q), causa un Factor V con actividad procoagulante normal pero resistente a la acción de la PCa.

En población caucásica la mutación Leiden es mucho más común que cualquier otra causa de trombofilia hereditaria, con una prevalencia de entre 2 y 15%, y es mucho más prevalente en población del norte de Europa en comparación con la población del sur. Dependiendo de la selección de los pacientes, la mutación Leiden se encuentra en 20 a 50% de aquellos que presentan el primer evento de tromboembolismo venoso. Los heterocigotos para esta mutación tienen entre 3 y 8 veces más riesgo de trombosis venosa, mientras que en homocigotos hasta 80 veces más.^{35,36}

Mutación 20210 del Alelo del Gen de la Protrombina. Este defecto recientemente descrito se asocia con incremento en los niveles plasmáticos de la protrombina que se traduce en una hiperactividad de la vía común de la coagulación, resultando en la formación de grandes cantidades de trombina. Esta mutación del gen de la protrombina fue informado por Poort en 1996,³⁷ donde describe la tendencia trombótica de algunos pacientes con niveles plasmáticos altos de la protrombina, esto debido a una mutación específica en el alelo A de la protrombina, sin embargo, el mecanismo trombótico de esta alteración no se conoce. La prevalencia del defecto es de 7.1% en los pacientes con trombosis y 1.8% en la población en general. Este defecto tiene un factor de riesgo importante para las trombosis venosas.

Polimorfismos del PAI-1. La expresión del gen del PAI-1 depende de diversos factores, tales como; endotoxinas, factor de necrosis tumoral alfa, factores de crecimiento, citocinas, insulina y otras hormonas, proteasas, hipoxia e importantemente el sistema renina-angiotensina-aldosterona a través de la enzima convertasa de la angiotensina, etc.³⁸

Las concentraciones plasmáticas del PAI-1, en parte dependen de la regulación genética. De acuerdo a los polimorfismos del gen del PAI-1 que se codifican en el cromosoma 7, parecen correlacionar con diferentes concentraciones plasmáticas del PAI-1.

Cuadro I. Incidencia de defectos moleculares más frecuentes que ocasionan trombosis en pacientes con trombosis y en población en general

Factor de Riesgo	Frecuencia en población general	Frecuencia en pacientes con trombosis
Deficiencia de Proteína C	0.2 – 0.4	3
Deficiencia de Proteína S	Desconocido	1 – 2
Deficiencia de Antitrombina	0 – 0.2	1
Factor V Leiden	5	20
Mutación de la Protrombina (20210A)	2	6
Incremento del Factor VIII (>150 IU/dL)	11	25
Hiperhomocistinemia (>18.5 mmol/L)	5	10

Existe un polimorfismo común conocido como 4G/5G en la región promotora. El alelo 5G es ligeramente menos transcripcional que el alelo 4G. El papel del polimorfismo 4G/5G en asociación con concentraciones elevadas del PAI-1 en el desarrollo de trombosis es positivo a pesar de la controversia.

Hasta el momento se han identificado 9 polimorfismos del PAI-1. El polimorfismo localizado a 675 pares de bases río arriba (upstream) del sitio de inicio de la transcripción, que consisten en una simple delección/inserción de una guanósina con una variación 4G o 5G. La delección del alelo (PAI-1 4G) se ha asociado con la incapacidad de unión de un represor transcripcional, que resulta en un incremento en la expresión del RNAm del PAI-1 y elevación en la concentración plasmática del PAI-1. Los individuos con el polimorfismo 4G/4G presentan concentraciones plasmáticas altas del PAI-1. También se ha demostrado que los individuos homocigotos al alelo 4G presentan concentraciones 25% más altas del PAI-1 tanto antigénica como su actividad funcional, lo que puede implicar resistencia contra los activadores del plasminógeno endógenos y externos. Algunos de estos polimorfismos no sólo se asocian con concentraciones altas del PAI-1 en individuos sanos, sino que también se han asociado en pacientes con trombosis arteriales y enfermedad tromboembólica venosa. Sin embargo, a pesar de esta información, existe controversia sobre el riesgo real de la presencia de estos polimorfismos en pacientes con trombosis.³⁹

Desde hace varios años se ha probado que el incremento del PAI-1 constituye un factor de riesgo independiente para infarto agudo al miocardio, incluso su elevación persistente induce retrombosis. Posteriormente, con la identificación del gen del PAI-1 y sus genotipos, se documentó la asociación de la elevación de los niveles de PAI-1.

De acuerdo a Hamsten y cols.⁴⁰ el incremento en la expresión del PAI-1 actualmente se considera como un factor de riesgo independiente para la enfermedad arterial coronaria.

Johanna G. van der Bom y cols. informaron en el 2003 un estudio donde documentan una mayor incidencia de muertes por infarto agudo del miocardio por las mañanas, lo que parece depender de la influencia circadiana del PAI-1. Este estudio documentó mayor concentración por las mañanas y parece depender de un factor transcripcional llamado CLIF (cycle like factor). En la región promotora del gen del PAI-1, la secuencias de (CACGTG) son responsables de la activación de PAI-1 por CLIF; localizados uno de ellos - 677 a - 672 pb, esto se traslapa con la región promotora del polimorfismo 4G/5G. Los homocigotos para el polimorfismo 4G/4G tuvieron las concentraciones más altas entre los individuos estudiados.⁴¹

Los resultados de los trabajos epidemiológicos estudiando los polimorfismos 4G y 5G del gen del PAI-1, demuestran un incremento en la concentración de PAI-1 en asociación con mayor incidencia de enfermedad arterial coronaria, sobre todo si existe el antecedente familiar de infartos en familiares de primer grado, además del riesgo para trombosis cerebral y también venosa.⁴²

Ruiz-Quezada y cols.⁴³ publicaron un trabajo en donde informan de la frecuencia de estos polimorfismos en población mexicana y encontraron: genotipo 4G/4G (14.55%), 4G/5G (39.09%) y 5G/5G (46.36%). La frecuencia del alelo 5G fue de 65.9% con una frecuencia baja del alelo 4G en sujetos sanos de México.

Festa y cols.⁴⁴ estudiaron los niveles séricos de PAI-1 y su relación con los diferentes genotipos en población de diferente origen étnico (negros, blancos e hispanos), y encontraron que la población negra tiene la concentración más baja de PAI-1 mientras que la población hispana tiene las concentraciones más altas en comparación con negros y blancos. Esto parece estar asociado con una mayor frecuencia de los genotipos 4G/4G y 4G/5G en comparación con los otros dos grupos. Asimismo, este estudio concluye que los niveles altos de PAI-1 son independientes de la resistencia a la insulina o el índice de masa corporal y parece correlacionar con el genotipo 4G/5G.

Resultados en la Ciudad de México

En México, en un estudio llevado a cabo por nuestro grupo en 200 pacientes con trombosis con edad menor de 45 años se realizó la investigación del diagnóstico molecular de las trombofilias primarias y se encontraron resultados que se muestran en el cuadro II.

Cuadro II. Frecuencia de defectos moleculares que ocasionan trombosis

Defecto	Frecuencia
Mutación V Leiden	0
Mutación 20210 de la Protrombina	4
Resistencia a la PCa	12
Deficiencia de Proteína C	5
Deficiencia de Proteína S	4
Deficiencia de Antitrombina	1
Total	27

En los resultados del polimorfismo del gen del PAI-1 en los pacientes con trombosis, se observaron las siguientes frecuencias: 4G/5G 55.7%, 5G/5G 32.8% y 4G/4G 11.5%, el polimorfismo más frecuente fue el 4G/5G.

Al sumar las frecuencias alélicas constatamos que el alelo más comúnmente observado fue el 5G con 88.5% y el alelo 4G en 67.2%. (Cuadro III).

Los pacientes con trombosis tuvieron una frecuencia más alta del polimorfismo 4G/5G ($p < 0.01$) comparado con la población sana, asimismo el descenso en la frecuencia de 5G/5G está en relación con un aumento en la frecuencia del alelo 4G en los pacientes con trombosis.

Estos dos defectos primarios presentan prevalencia baja en la población mexicana estudiada y coinciden con los

Cuadro III. Resultados de las frecuencias de los polimorfismos del PAI-1 en los pacientes con trombofilia primaria

Tipo de polimorfismo	Frecuencia	%
Polimorfismo 4G/4G	14	11.5
Polimorfismo 4G/5G	68	55.7
Polimorfismo 5G/5G	40	32.8
Total	122	100.0

estudios publicados en población nativa de América Latina, específicamente Brasil. Esto pudiera implicar que estos defectos pueden ser mutaciones importadas de población de origen europeo.⁴⁵

En México, algunos grupos de investigadores han estudiado los factores de riesgo primario que ocasionan trombofilia primaria. Ruiz Argüelles y cols.,^{46,47} en un estudio de 39 pacientes con trombosis en la ciudad de Puebla, informan la siguiente frecuencia de causas de trombofilia primaria: Factor V Leiden 4 casos (10%), Haplotipo HR2 11 casos (28%), Factor V Hong Kong un caso (2%), Factor V Cambridge 0, Factor V Liverpool 0 y la mutación 20210 del gen de la protrombina 5 casos (13%). De acuerdo con este estudio de población seleccionada, se encontró una prevalencia de 10% de Leiden que constituye una frecuencia más baja a lo informado en población caucásica que es de 18 a 20%. En relación con la mutación 20210 del gen de la protrombina A, se encontró prevalencia mayor a lo informado 13% *versus* 6% en población americana y europea. Por otra parte, en nuestro estudio de la población mestiza mexicana de la Ciudad de México, no encontramos defectos atribuibles al Factor V Leiden y baja prevalencia de la mutación 20210 comparado con la población mundial.

La determinación de polimorfismo del PAI-1 en este estudio demostró en sujetos sanos que el polimorfismo más frecuente fue el 4G/5G en 55.5% y la frecuencia alélica más común fue el 5G con 88.5%. Estos resultados pueden tener cierta concordancia con el estudio publicada por Ruiz Quezada y cols.⁴³ que encontraron el polimorfismo más frecuente fue el 4G/5G con 39.09%, donde la frecuencia del alelo 5G fue de 65.9%.

Por otra parte, en el resultado del polimorfismo en los pacientes con trombosis se observó una mayor frecuencia del polimorfismo 4G/5G y un mayor frecuencia del alelo 4G, esto demuestra ser diferente a la población sana de los controles, incluso del estudio también en población sana de Ruiz Quezada y cols.⁴³

Conclusiones

Con relación en los defectos moleculares que ocasionan trombosis, es importante el conocimiento de los factores de riesgo primarios que influyen en la elevada frecuencia de muertes por trombosis en México, a fin de establecer medidas preventivas que disminuyan esta frecuencia.

Este estudio abre un campo de investigaciones de búsqueda de factores primarios específicos en la problemática de la población mexicana que están muy relacionados con la alta incidencia de diabetes, síndrome metabólico y obesidad.⁴⁸

Referencias

- Martínez-Murillo C. Mecanismos de activación de la coagulación. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2006;44:51-58.
- Quintana GS, Martínez-Murillo C. Fisiología de la hemostasia secundaria. *Manual de Hemostasia y Trombosis*, Ed. Prado, México 1996:23-48.
- Martínez-Murillo C, Quintana GS. Mecanismos de regulación de la hemostasia. *Manual de Hemostasia y Trombosis*, Ed. Prado, México 1996:65-76.
- Martínez-Murillo C. Actualidades en el diagnóstico y tratamiento de los defectos hereditarios y adquiridos de la hemostasia. *Gac Med Mex* 2000;136:117-119.
- Margaglione Maurizio, Castman Giancarlo, Morfini Massimo. The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica* 2008;93:722-728.
- Benz-Ezra JM. Amplification methods in the molecular diagnosis of genetic diseases. *Clin Lab Med* 1995;15:795-815.
- Oldenburg J, EL Maarri O. New insight into the molecular basis of hemophilia A. *Int J Hematol* 2006;83:96-102.
- Kempton C, White G. How we treat a hemophilia A patient with factor VIII inhibitor. *Blood* 2009;113:11-17.
- Perry DJ, Goodeve A. The UK National External Quality Assessment Scheme (UK NEQAS) for molecular genetic testing in haemophilia. *Thromb Haemost* 2006;96:597-601.
- Green PM, Bagnall RD. Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one third of the population. *Br J Haematol* 2008;143:115-128.
- Lin SY, Su YN. Mutation spectrum of 122 hemophilia A families from Taiwanese population by LD-PCR, DHPLC, multiplex PCR and evaluating the clinical application of HRM. *BMC Med Genet* 2008;9:53.
- Cataldo G, Dargenio V. Haemophilia A. Molecular insights. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:450-461.
- Sacena R, Mohanty S. Prenatal diagnosis of haemophilia. *Indian J Pediatr* 1998;65:645-649.
- Ljung RC. Prenatal diagnosis of haemophilia. *Baillieres Clin Haematol* 1996;9:243-257.
- Shetty S, Ghosh K. Carrier detection and prenatal diagnosis in families with haemophilia. *Nat Med J India* 2001;14:81-83.
- Deutz, Terlow PP. Lasekoot. Inversions in the factor VIII gene: improvement of carrier and prenatal diagnosis in Dutch haemophilia families. *J Med Genet* 1995;32:296-300.
- Chen TD, Zhang YZ. Molecular diagnosis of haemophilia A in Chinese patients by an analysis of inversions in the factor VIII gene. *Haematopathol Mol Hematol* 1996;10:63-67.
- Gau JP, Hsu HC. Rapid detection of intron 22 inversions of the factor VIII gene in Chinese patients with severe hemophilia A. *J Chin Med Assoc* 2003;66:518-522.
- Bogdanova N, Lemcke B. Seven novel and four recurrent point mutations in the factor VIII (F8C) gene. *Hum Mutat* 2001;18:546.
- Hertzberg MS. Genetic Testing for Thrombophilia Mutations. *Sem Thromb Hemost* 2005;31:33-38.
- Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999;353:1167-1173.
- Bertina R. Molecular risk factors for thrombosis. *Thromb Haemost* 1999;82:601-609.
- De Stefano V, Finazzi G, Manucci PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* 1996;87:3531-3544.
- Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* 2001;344:1222-1231.
- Lane DA, Bayston T, Olds RJ, et al. Antithrombin mutation database; 2nd (1997) update. For the plasma coagulation inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1997;77:197-211.
- Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, et al. Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. On behalf of the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1995;73:876-889.
- Gandridge S, Borgel D, Sala N, et al. Protein S deficiency: a database of mutations summary of the first update. *Thromb Haemost* 2000;84:918.
- Zivelin A, Gritlin JH, Xu X, et al. A single genetic defect for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood* 1997;89:397-402.
- Zivelin A, Rosenberg N, Faier S, et al. A single genetic origin for the common prothrombotic G20210 polymorphism in the prothrombin gene. *Blood* 1998;92:1119-1124.
- Nar H, Bauer M, Stassen JM, Lang D, Gils A, Declercq J. Plasminogen activator inhibitor 1, structure of the native serpin, comparison to its other conformers and implications for serpin inactivation. *J Mol Biol* 2000;197:683-695.
- Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson M. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor antithrombotic response to activated protein C: Prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1004-1008.
- Dahlbäck B. New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg 506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1995;74:139-148.
- Griffin J, Heeb M, Kojima Y, Fernández J. Activated protein C resistance: molecular mechanisms. *Thromb Hemost* 1995;74:444-448.
- Bertina R, Reitsma P, Rosendaal F. Resistance to activated protein C and factor V Leiden as risk factors for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1995;74:449-453.
- Svensson P, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as basis for venous thrombosis. *New Engl J Med* 1994;330:517-522.
- Dahlbäck B. Inherited thrombophilia: Resistance of activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood* 1995;85:607-614.
- Poort SW, 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;88:3698-3703.
- Huber K, Christ G, Wojta J, Gulba D. Plasminogen activator inhibitor type-1 in cardiovascular disease. *Status report* 2001. *Thromb Res* 2001;103:S7-S19.

39. Tjörnlund A, Andersson M, OJD K, Ladvall P, Jean C. Rapid genotyping of haemostatic gene polymorphism using the 5' nuclease assay. *Thromb Haemost* 2003;89:936-942.
40. Hamsten A, de Faire U, Walldius G, Dahlen G, Szamosi A, et al. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987;2:3-9.
41. van der Bom JG, Bots ML, Haverkate F, Kluit C, Grobbee DE. The 4G/5G polymorphism in the gene for PAI-1 and the circadian oscillation of plasma PAI-1. *Blood* 2003;101:1841-1844.
42. Stegner M, Uhrin P, Peternel P, Mavri A, Salobir-Pajnac B, Stare J, Binder B. The 4G/5G sequence polymorphism in the promoter of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI 1) gene: relationship to plasma PAI 1 level in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1998;79:975-979.
43. Ruiz-Quezada S, Vázquez-Del Mercado M, Parra-Rojas I, Rangel-Villalobos H, Best-Aguilera C, Sánchez-Orozco LV, et al. Genotype and allele frequency of PAI-1 promoter polymorphism in healthy subjects from the west of Mexico. Association with biochemical and hematological parameters. *Annales de Génétique* 2004;47:155-162.
44. Festa A, D'Agostino R, Rich S, Jenny N, Tracy RP, Haffner SM. Promoter (4G/5G) Plasminogen Activator Inhibitor-1 Genotype and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Levels in Blacks, Hispanics, and Non-Hispanic Whites. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation* 2003;107:2422-2427.
45. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1993;353:1167-1173.
46. Ruiz-Argüelles. Primary thrombophilia in Mexico. II. Factor V G1691A (Leiden), prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in thrombophilic Mexican mestizos. *Am J Hematol*. 2001;66(1):28-31.
47. Ruiz-Argüelles. 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(5):600-604.
48. Martínez-Murillo C, Quintana GS, Ambríz FR, Hernández PM. El Problema Trombótico en México. *Rev Hematol* 2000;1:17-22.