



BIBLIOTECA CENTRAL
USO ÚNICAMENTE EN SALA

**UNIVERSIDAD POPULAR AUTONOMA DEL ESTADO DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA**

LABORATORIOS CLINICOS DE PUEBLA

**RESISTENCIA A LA PROTEÍNA C ACTIVADA: UNA NUEVA CONDICION
TROMBOFÍLICA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA CLÍNICA**

PRESENTA:

DR. JUAN CARLOS GALLAGA SOLÓRZANO

**DIRECCIÓN DE TESIS:
DR. GUILLERMO J. RUIZ ARGÜELLES**

MARZO de 1996

TE 616.07

#64084

GAL 1996

GALLAGA SOLORZANO, JUAN CARLOS

RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA: UNA NUEVA CONDIC



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESISTENCIA A LA PROTEÍNA C ACTIVADA: UNA NUEVA CONDICIÓN TROMBOFÍLICA

RESÚMEN:

En los últimos tres años han ocurrido avances notables en el esclarecimiento de las causas de la trombofilia. Hasta hace poco los estudios de laboratorio en pacientes con trombofilia familiar permitían esclarecer la causa sólo en el 5-10% de los casos, en los que se identifican deficiencia de proteína C de coagulación, de proteína S de coagulación, de antitrombina III, etc. La reciente identificación de la resistencia a la proteína C activada (RPCa) ha cambiado este panorama: El 50% de los pacientes con trombofilia familiar tienen el genotipo de la RPCa, que supone la mutación del nucleótido G por A en la posición 1691 del gen del factor V, lo que produce la mutación R-506-Q (tipo Leiden) del factor V. Esta mutación, que codifica la síntesis de un factor V con actividad procoagulante normal pero "resistente" a la acción lítica de la proteína C activada, ocurre hasta en el 15% de la población general y es actualmente el defecto genético relacionado con enfermedad más frecuente de todos. El fenotipo de la RPCa se estudia en el laboratorio por medio de una modificación de la medición del tiempo de tromboplastina parcial activada y puede presentarse en pacientes con el genotipo de la RPCa o ser secundario a enfermedades autoinmunes, hepatopatías, empleo de anovulatorios, embarazo, etc. El estudio de todo paciente con trombofilia debe incluir la investigación del fenotipo y en su caso, el genotipo de la RPCa. Este estudio, junto con las investigaciones de las actividades antigénica y procoagulante de las proteínas C, S y antitrombina III, permiten esclarecer la causa de la trombofilia familiar en 60-70% de los casos.

TROMBOFILIA:

El término de *trombofilia* fue usado por primera vez en 1965 por Egeberg para designar a una enfermedad asociada a trombosis venosa; se refería entonces específicamente a la deficiencia familiar de antitrombina III (1). Desde entonces, el término se ha usado para referirse a diversas condiciones, adquiridas o heredadas, en las que hay riesgo de trombosis arterial o venosa. El antónimo de trombofilia es hemofilia, término de uso común que agrupa a diversos padecimientos en los que hay riesgo de sangrado. Trombofilia es un término correcto que incluye a varios padecimientos que se han descrito como situaciones de hipercoagulabilidad o estados pre-trombóticos (2). Los padecimientos trombóticos son responsables de más de la mitad de los fallecimientos de los miembros de sociedades desarrolladas y los estados de trombofilia suponen un desequilibrio entre las actividades de los mecanismos pro-coagulantes y anticoagulantes naturales. Existen varias anomalías que pueden condicionar un estado de trombofilia: por un lado puede haber *hipercoagulabilidad* debida a aumento en el número y/o función de las plaquetas; a incremento en los niveles o actividad de algunos de los factores procoagulantes y a disminución en la actividad de los inhibidores fisiológicos de la coagulación, ya sea por falta del inhibidor o por disminución de su activación (2) y por otro lado, la *hipofibrinólisis* puede ser debida a disminución de la activación del plasminógeno, a incremento en los inhibidores de la fibrinólisis o a capacidad disminuida de lisis de la fibrina (2). Se reconocen dos tipos de trombofilia, la primaria o heredada y la secundaria (2,3). Dentro de los estados de trombofilia primaria o heredada, los mencionados con mayor frecuencia antes de febrero de 1993 eran las deficiencias de proteína C de la coagulación (PC) 2, 4; de proteína S (PS) 2, 4 y de antitrombina III (At-III) 2, 3. La PC es una serpina ("serin-protease-inhibitor") que al activarse por el complejo

trombina/trombomodulina en la superficie de la célula endotelial, inactiva los factores Va y VIII y depende para su síntesis hepática de vitamina K. La deficiencia se transmite con carácter autosómico dominante y el gen que codifica su síntesis se localiza en el cromosoma 2. La deficiencia de PC puede ser tanto antigénica como funcional (tipo I), o sólo funcional (tipo II). La proporción de sujetos heterocigotos para la deficiencia es del orden de 0.1 a 0.3% de la población general; en ellos los niveles de PC son menores del 60% del valor normal (2, 3). Los homocigotos para la deficiencia sufren *purpura fulminans*, una condición de extrema gravedad que termina con la vida de los recién nacidos en pocos días (3,4). La deficiencia heredada de PS se transmite con carácter autosómico codominante y la proporción de sujetos heterocigotos u homocigotos para la deficiencia no se conoce en detalle; aparentemente es menos frecuente que la de PC (2,4). La PS es también dependiente de vitamina K, con actividad de cofactor de la PC. La AT-III es otra serpina responsable del 75% de la actividad inhibitoria de la trombina (4); su deficiencia se transmite con carácter autosómico dominante. La proporción de heterocigotos es de 1 en 2000 y en ellos las concentraciones son inferiores a 50%; aproximadamente el 50% de los sujetos heterocigotos para la deficiencia sufren un episodio vaso-oclusivo en la adolescencia. El estado homocigoto para la deficiencia de AT-III es incompatible con la vida (2,3).

El hacer caso omiso del estudio de las causas de la trombosis lleva implícita una pena que puede ser catastrófica como es la repetición del episodio vaso-oclusivo, posiblemente más grave, o la ocurrencia del mismo en otro miembro de la familia, en los casos de trombofilia familiar (2). Sin embargo, los estudios orientados a aclarar la causa de la trombofilia familiar de pacientes con trombosis, hasta antes de febrero de 1993, resultaban positivos sólo en el 4 a

5% de los casos; en ellos se identificaban deficiencias de PC, de PS o de At-III (5). A partir de febrero de 1993, cambió la historia de la trombofilia familiar:

RESISTENCIA A LA PROTEINA C ACTIVADA (RPCa)

En febrero de 1993, Björn Dahlbäck y cols. (6) describieron un paciente trombofílico en Suecia en el que la PC activada (PCa) era incapaz de prolongar *in vitro* el valor de su tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa); 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 trastorno se encontró en otros miembros de la familia y en otros pacientes trombofílicos no relacionados con el caso índice. Dahlbäck *et al.* supusieron la existencia de otro cofactor de la PCa, además de la ya conocida PS, y le llamaron tentativamente "cofactor II de la PCa" (6). Por otro lado, en Estados Unidos de Norteamérica, los grupos de Griffin (7) y Mann (8), respectivamente identificaron el fragmento molecular de la PCa que interactúa con el factor V activado (FVa) y definieron que la inactivación del FVa por la PCa ocurre por la ruptura del FVa en los residuos Arg 505 y Arg 306. Más tarde, Griffin y cols. *al* encontraron que en 50%, aproximadamente, de pacientes trombofílicos se encuentra la RPCa (9), lo que también fue confirmado por Koster y cols, del grupo de Roger Bertina en Leiden, Holanda (10). En octubre de 1993 se describió por primera vez que los anticoagulantes lúpicos (AL, -11-) "interfieren" en el suero con la investigación de la RPCa *in vitro* (9). Dahlbäck y Hildebrand (12) describieron en febrero de 1994 que el FV normal purificado es capaz de corregir *in vitro* la RPCa, a pesar de que las cantidades de FV en los plasmas con RPCa son normales e infirieron que la RPCa, en vez de deberse a un nuevo factor antitrombótico, puede ser causada por un FV con función procoagulante normal, pero "resistente" a la acción catalítica de la PCa. Finalmente, en mayo de 1994, Bertina y cols, en

Leiden (13) demostraron que el fenotipo de la RPCa está asociado a la homo o heterocigosidad de la mutación en 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 FV con actividad procoagulante normal pero resistente a la acción de la PCa (14, 15), ya que la mutación se encuentra en un punto vecino al sitio de fractura del FV por la PCa (7,8). Quedó así establecido que el "nuevo" factor antitrombótico era en realidad el "viejo" factor V (16). La mutación del gen del FV, identificable por medio de biología molecular empleando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (14-15) corresponde al *genotipo* de la RPCa (ver figura 2), en tanto que la anormalidad de la prueba *in vitro*, que mide el alargamiento del TTPa en presencia de PCa, corresponde al *fenotipo* de la RPCa.

GENOTIPO DE LA RPCa:

Más del 80% de los pacientes con formas familiares de RPCa tienen la mutación Leiden del FV; sin embargo, hay otras mutaciones genéticas en el mismo gen que pueden causar el fenotipo de RPCa (17). La mutación R-506-Q se presenta en el 2% de la población holandesa asintomática (13) (ver figura 2) y es 10 veces más alta que la de los otros factores genéticos conocidos de riesgo trombótico como las deficiencias heredadas de PC, PS y At-III juntas (2, 17-19). La prevalencia de la mutación en algunas poblaciones de Suecia cercanas a Malmö alcanza el 15% (Dahlbäck, comunicación personal), pero en otros países es menor (20). Es interesante señalar que en aborígenes de Africa, Asia y América, la prevalencia de la mutación es mucho más baja, hasta del 0% (20), lo que sugiere distribución racial del gen. En pacientes con trombofilia la incidencia puede alcanzar 40 a 50% (5, 17-19). En mujeres embarazadas que desarrollan

fenómenos vaso-oclusivos, la proporción de pacientes con fenotipo de RPCa alcanza el 60% (17-19). El 85% de los pacientes con RPCa heredada son heterocigotos y el resto homocigotos (17). Los homocigotos tienen un riesgo 50 a 100 veces mayor de sufrir trombosis que la población general (17-19) y los heterocigotos sufren una trombofilia menos grave, con un riesgo de trombosis 5 a 10 veces mayor que la población general (17-19). La asociación de RPCa heredada y otra condición trombofílica como la deficiencia de PC incrementa el riesgo de trombosis hasta 70% (18, 22, 23). La investigación de la mutación Leiden del gen del FV se hace en el laboratorio empleando la reacción en cadena de la polimerasa

La mutación tipo Leiden del gen del factor V es el defecto genético con mayor prevalencia asociado con enfermedad, hasta ahora identificado (18) y se ha especulado que podría ser secundario a presión de selección genética positiva, ya que cierto estado hipercoagulable podría ser protector en situaciones de riesgo de sangrado (18). Conviene recordar que los factores de riesgo de la trombosis son artefactos de la vida moderna (18) y que antaño era más frecuente morir por sangrado que por trombosis.

FENOTIPO DE LA RPCa:

La evaluación *in vitro* del alargamiento del TTPa en presencia de cantidades conocidas de PCa constituye la prueba funcional o fenotipo de la RPCa. (15, 17-18, 21, 24-25). Esta prueba podría considerarse como la prueba de escrutinio para la investigación de la RPCa. En condiciones normales, la relación del TTPa en presencia de PCa sobre el TTPa sin PCa es mayor de 2 a 2.5, es decir, la PCa prolonga el TTPa. Cuando hay RPCa, este cociente es menor de 2.5 (17, 18). Además de la mutación G → A del gen del FV que causa la R 506 Q de la proteína, otras condiciones adquiridas pueden producir el fenotipo de la RPCa.

MATERIAL Y METODOS.

Se estudiaron 44 pacientes con antecedentes de trombofilia en los cuales se desconocía la etiología del padecimiento. El tiempo de estudio fue de julio de 1994 a diciembre de 1995. A cada uno de estos pacientes se les realizó la prueba de la RPCa (Fenotipo). Técnica: Se les tomo sangre con citrato en proporción 9:1, en tubo de plástico a cada uno de los pacientes, al plasma se le realizó la prueba por coagulometria dentro de las primeras 4 horas. El producto usado para la realización de la prueba fue el *ACTICLOT APC* de american diagnostica inc. Se reconstituyó el reactivo con PCa ,se incubaron 100 μ L del plasma del paciente a 37⁰C en una cubeta de coagulación , posteriormente se agregaron 100 μ L de reactivo de TTPa e incubaron durante 5 minutos luego se agregaron 100 μ L de cloruro de calcio y se determinó el TTPa, en este último paso en otra cubeta de coagulación se sustituyó el cloruro de calcio por PCa y se midió el tiempo de coagulación teniendo estas dos mediciones se obtuvo un cociente que resulta de la división del TTPa con PCa entre el TTPa con cloruro de calcio, los valores normales de este cociente fueron de 2.5 a 3 , se consideraron con RPCa a los pacientes con un cociente de 2.5 o menos , ver figura 3 . A 7 pacientes que tuvieron el fenotipo a la RPCa se les investigó el genotipo buscando la mutación Leiden por reacción de la polimerasa en cadena. Se obtuvo sangre con con anticoagulante EDTA para la investigación de la mutación Leiden del factor V por RFLP-PCR (restriction fragment lenght polymorphism, polymerase chain reaction). Una región del gen del factor V que incluye los nucleótidos 1690 a 1692 del codón 506 se amplificó por PCR y se sometió a digestión con Mnl. El patrón de restricción se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida. Los oligonucleótidos empleados están descritos en la referencia número 21.

RESULTADOS

De los 44 pacientes en estudio 32 fueron del sexo femenino y 12 del sexo masculino, ver figura 5. Los pacientes que presentaron el fenotipo de la RPCa fueron 24, ver figura 4. La distribución por sexo de los pacientes que presentaron RPCa fue de 17 mujeres y 7 varones, ver figura 6. En 7 de estos pacientes se investigó el genotipo (mutación R-506-Q) y se encontró en 1, ver figura 7. En 13 pacientes se investigaron anticuerpos antifosfolípido, y 4 arrojaron resultados positivos en esta prueba, ver figura 8.

Entre ellas, se han descrito la presencia de anticoagulantes lúpicos (AL) y / o anticuerpos anti-fosfolípido (AAF) (26-35), las hepatopatías (36), el embarazo (37), la ingestión de anovulatorios (38). En el caso de los padecimientos autoinmunes que cursan con AAF o AL, es interesante señalar que inicialmente se consideró que estos autoanticuerpos (11) "interferían" con la investigación *in vitro* del fenotipo de la RPCa (9, 32), y que ahora se ha encontrado que la presencia del fenotipo de RPCa en pacientes con AL / AAF es un marcador muy útil para predecir trombofilia en sujetos con estos autoanticuerpos (26, 27). Los anticuerpos anti-beta 2-GP-1, una forma de AAF aún más relacionada con trombofilia que los AAF que sólo identifican fosfolípidos (39), pueden condicionar *in vitro* el fenotipo de la RPCa (40); este hallazgo se ha considerado como una posible explicación a la producción del fenotipo de la RPCa en pacientes con AL / AAF, aún cuando otras explicaciones como los anticuerpos anti-PC, anti-PS y anti-FV (17, 26, 27) también se han ofrecido. Curiosamente, en el síndrome de anticuerpos anti-fosfolípido (SAAF), la proporción de pacientes con el genotipo de la RPCa no es mayor que la de la población general (33-34, 41-43). En el SAAF (26, 27) y probablemente en el embarazo (37), la ocurrencia de RPCa se asocia a trombofilia. Con el objeto de evitar la "interferencia" causada por los AAF y/o AL en la evaluación del fenotipo de la RPCa, se ha recomendado hacer la prueba diluyendo 1:5 la muestra en plasma deficiente en factor V, modificación que también permite hacer la evaluación de la RPCa funcional en pacientes quienes reciben anticoagulantes orales (44).

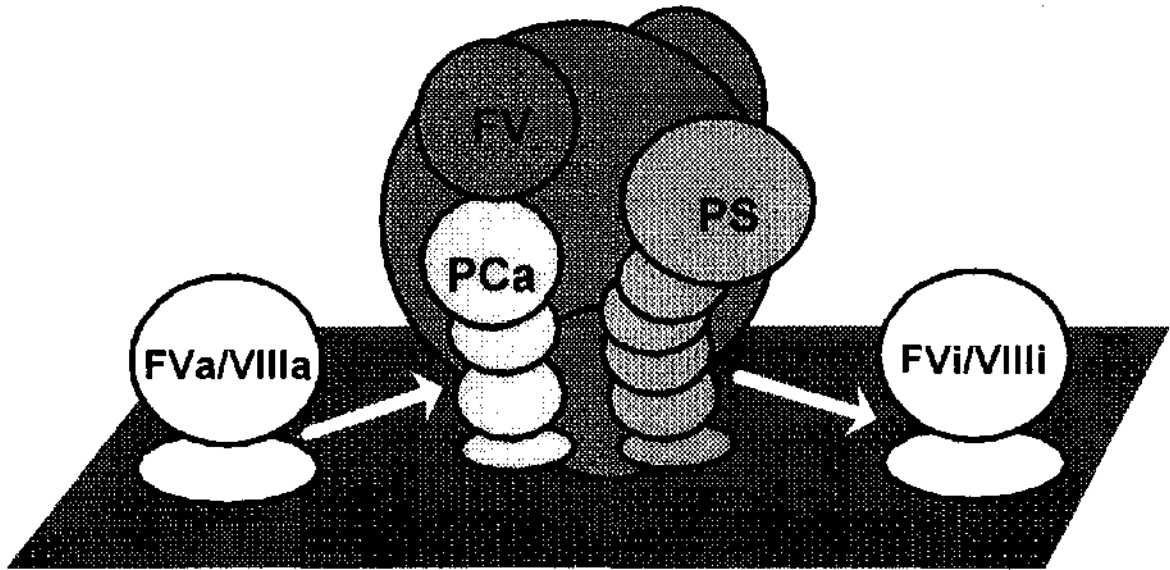
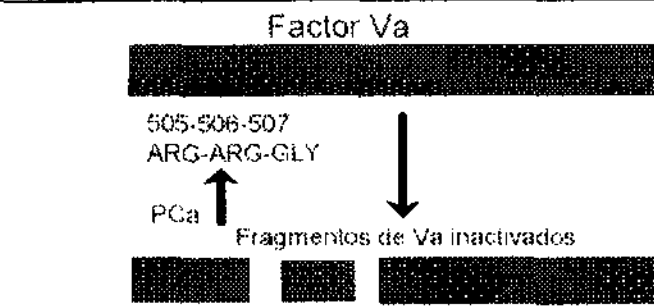
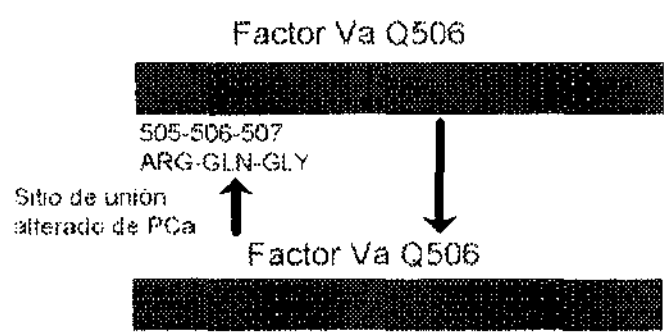


FIGURA 1: Modelo molecular especulativo de la degradación de los factores V (FV) y VIII (FVIII) de la coagulación por la proteína C activada (PCa). En la superficie de las membranas de fosfolípidos, el complejo proteína S (PS) / FV constituye un sitio de unión para la PCa. La resistencia a la PCa está causada por el cambio de Arg 506 por Gln en el sitio de fractura del FV por la PCa, lo que produce un FV resistente a la acción de la PCa. FVa y FVIIIa son las formas activas en tanto que FVi y FVIIIi son las formas inactivas de los FV y FVIII, respectivamente. Adaptado de Dahlbäck B. (18).



A INACTIVACION POR PCa



B RESISTENCIA A LA PCa

FIGURA 2: A) Inactivación del factor Va por la PCa en el sitio de rompimiento de la PCa en la posición 506 del factor Va. B) Imposibilidad para inactivar el factor Va por la PCa debido a una sustitución en la posición 506 del factor Va. Adaptado de Samama. (49)

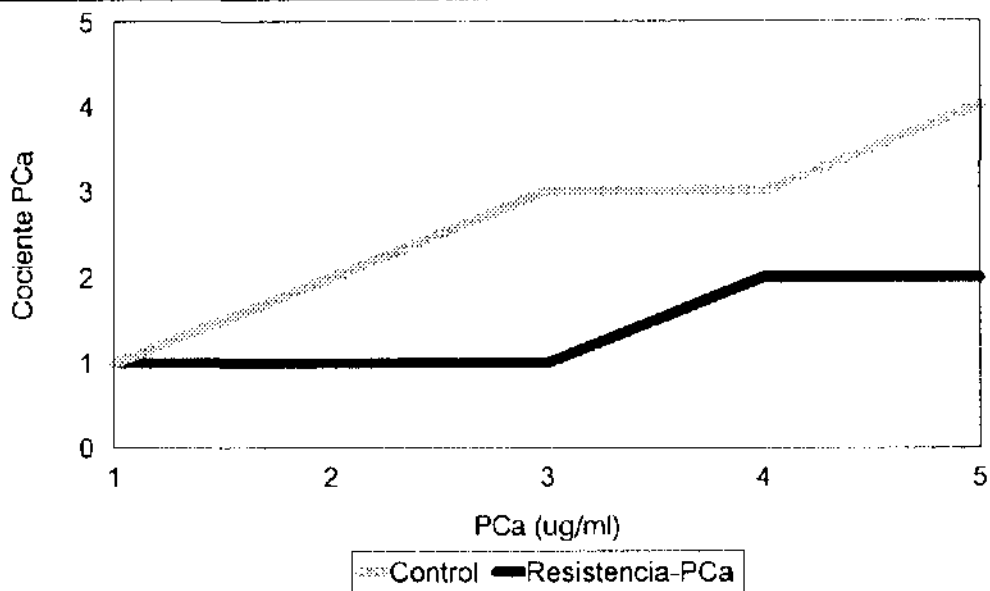
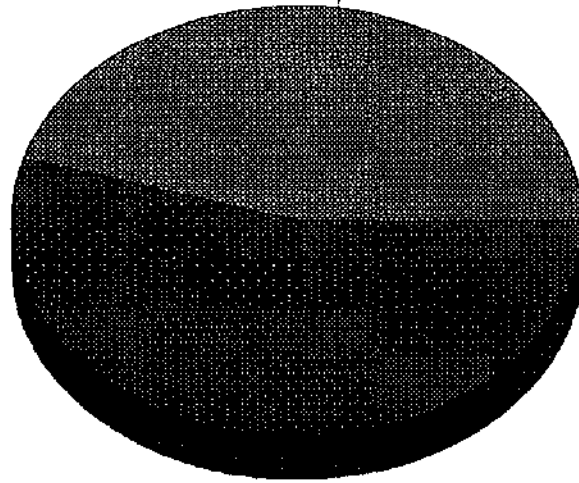


FIGURA 3: Resistencia a la PCa. En una respuesta normal (control), la PCa prolonga el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa). En contraste el plasma de un paciente con trombosis recurrente manifestando resistencia a la PCa. El cociente resulta de la división del TTPa con PCa dividido entre el TTPa sin PCa.

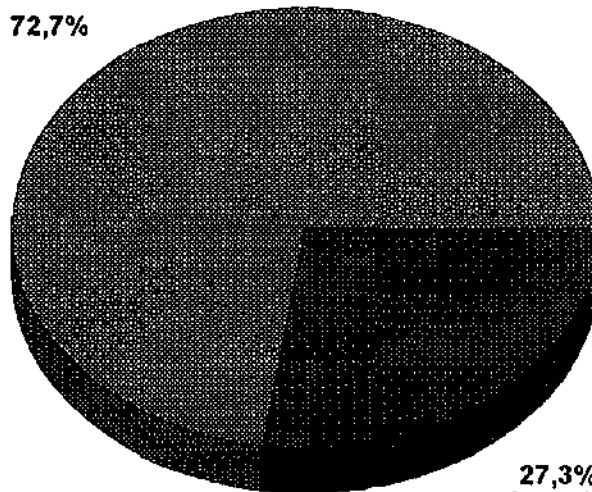
NEGATIVOS
45,5%



54,5%
POSITIVOS

FIGURA 4: Fenotipo de la resistencia a la PCa.

Femenino
72,7%



27,3%
Masculino

FIGURA 5: Distribución por sexo de los pacientes a los que se les realizó el fenotipo a la RPCa.

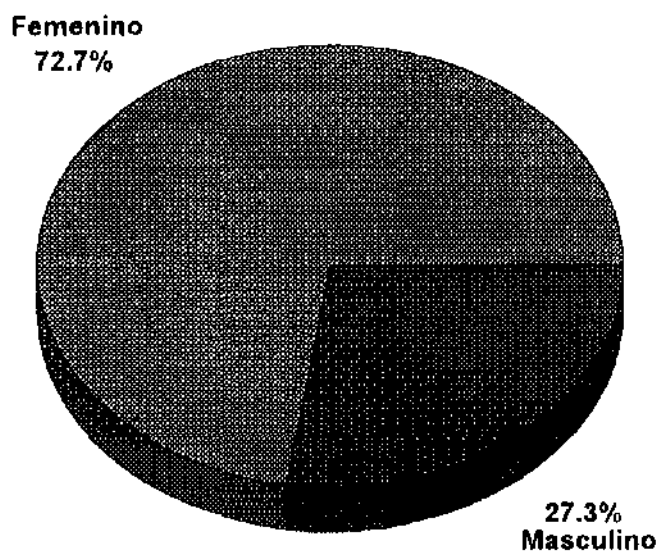


FIGURA 6: Distribucion por sexo de los pacientes que presentaron el fenotipo de la RPCa.

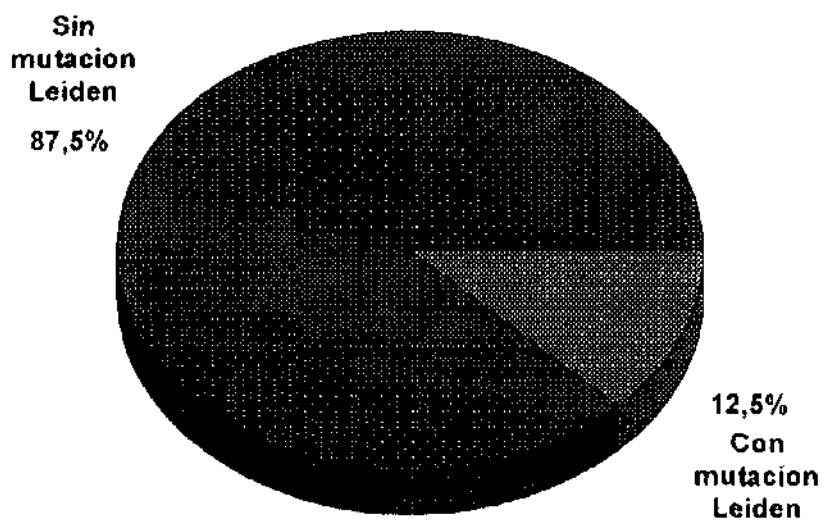
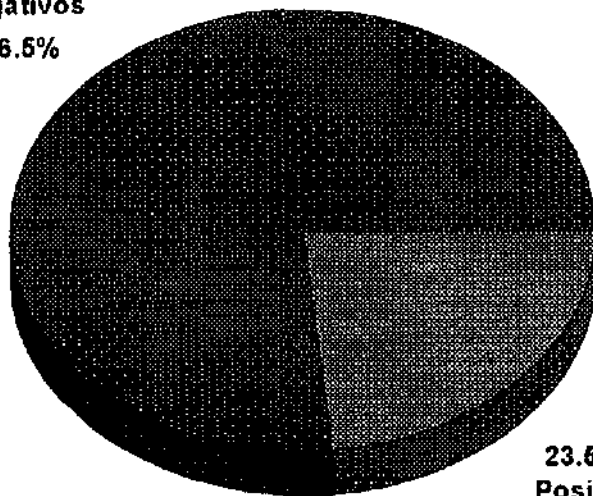


FIGURA 7: Pacientes con fenotipo de la RPCa en los que se detectó la mutación Leiden (Genotipo).

Negativos
76.5%



23.5%
Positivos

FIGURA 8: Pacientes con RPCa en los que se detectaron anticuerpos antifosfolípido.

DISCUSION:

La prevalencia de la mutación tipo Leiden (G → A) del gen del FV en la población mexicana no se conoce. En este grupo de 44 pacientes trombofílicos estudiados por nosotros para aclarar el origen del estado hipercoagulable, encontramos el fenotipo de la RPCa en 24 lo que corresponde al 54.5% (33). En 7 de estos pacientes se investigó adicionalmente el genotipo (mutación R-506-Q) y se encontró en uno (33). El fenotipo de RPCa se ha encontrado en el 30% de pacientes mexicanos con infarto al miocardio (45), pero en ellos no se ha aclarado se trata de formas heredadas o adquiridas de la RPCa. Otros autores (26) y nosotros (34, 41) hemos encontrado que entre el 30 y el 50% de los pacientes con padecimientos autoinmunes y AL / AAF tienen el fenotipo de RPCa. Independientemente de los pacientes anteriormente descritos, en 22 enfermos con SAAF encontramos la mutación Leiden del factor V en sólo un paciente (34, 41, 42), hallazgo similar al hecho en Inglaterra (43), lo que sugiere que esta mutación no es más prevalente en pacientes con SAAF que en la población general. También hemos encontrado que la presencia de AL y/o AAF es una causa frecuente del fenotipo de RPCa en nuestro medio (33). En una familia de la ciudad de Puebla se ha identificado la coexistencia de deficiencia de PC de coagulación y fenotipo de RPCa: el propósitus, un hombre de 34 años tiene una forma muy grave de trombofilia, en tanto que tres hermanas, con fenotipo de RPCa y cifras normales de PC, no han tenido episodios vasooclusivos. De manera interesante, la mutación G → A del gen del FV no se encontró en esta familia, por lo que es posible que la RPCa se deba en ellos a otra mutación genética como ocurre en menos del 20% de los pacientes con formas familiares de RPCa (13, 17, 18). Se han iniciado estudios adicionales para aclarar la causa de esta forma familiar de RPCa sin la mutación Leiden del

factor V. La investigación del fenotipo de la RPCa se ha comenzado a practicar de manera rutinaria en el estudio de pacientes trombofilicos en algunas instituciones del país (33, 45-46).

RECOMENDACIONES:

1) La investigación del fenotipo del RPCa debe ser el paso inicial del estudio de todo paciente con trombofilia, heredada o adquirida; la posibilidad de encontrarla presente es 10 veces mayor que la posibilidad de encontrar deficiencia de PC, PS o At-III, estudios que no deben omitirse, teniendo en cuenta que puede haber coexistencias (2, 18). En conjunto, todos estos estudios permitirán establecer la causa del 50 al 70% de los casos de trombofilias familiares. Deben practicarse idealmente tanto la prueba original como la modificada, diluyendo la muestra en plasma deficiente en factor V (44, 47). En los pacientes con fenotipo de RPCa deben investigarse el genotipo de RPCa (mutación G -> A 1691) y la presencia de anticoagulantes lúpicos y/o anticuerpos antifosfolípido. Es posible que los pacientes con RPCa tengan una trombofilia menos grave que la que se observa en otros estados de trombogénesis primaria (48).

2) Desde el punto de vista terapéutico, el Dr. Dählback (17, 47) recomienda:

a) En heterocigotos para la R-506-Q del FV, sin otros defectos anticoagulantes ni historia personal ni familiar de trombosis, se debe emplear profilaxis con anticoagulantes únicamente en situaciones con riesgo de trombosis, como cuando se someten a cirugía mayor.

b) En heterocigotos quienes han sufrido episodios vaso-oclusivos recurrentes, es recomendable la anticoagulación a largo plazo. Si ha habido sólo una trombosis, la anticoagulación se hace sólo en situaciones de riesgo.

c) En heterocigotos con alguna otra condición trombofílica asociada, o en homocigotos, la anticoagulación profiláctica es recomendable; si ya hubiera ocurrido algún episodio vaso-oclusivo, está indicada la anticoagulación prolongada.

BIBLIOGRAFIA:

- 1) Egeberg O.: Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. *Throm Diath Haemorr* 1965; 13:516-530.
- 2) Ruiz-Argüelles GJ.: Trombofilia. En Ruiz-Argüelles GJ (editor): *Fundamentos de Hematología*. 1a. edición, 1a. reimpresión. Editorial Médica Panamericana. México 1995; pp. 233-239.
- 3) Ruiz-Argüelles GJ.: El laboratorio en el estudio de pacientes con trombosis y estados pre-trombóticos. *Gac Med Mex* 1989; 125:191-195.
- 4) Lobato-Mendizábal E, Ruiz-Argüelles GJ.: Proteína C, proteína S y trombomodulina: Uno de los mecanismos antitrombóticos naturales. *Rev Invest Clin (Mex)*. 1990; 42:54-62.
- 5) Navarro JL, García-Avelló A, Pardo A, César JM.: Resistencia a la proteína C activada. Crónica de un descubrimiento. *Rev Iberoamer Tromb Hemost* 1994; 7:237-239.
- 6) Dahlbäck 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; 90:1004-1008.
- 7) Mesters RM, Griffin JH. Identification of a sequence in the light chain of human activated protein C essential for its interaction with factor Va. *Thromb Haemost* 1993; 69:722.
- 8) Kalafatis M, Mann KG.: The mechanism of inactivation of factor Va by activated protein C involves two cleavages of the heavy chain of the cofactor: Arg 505 and Arg 06. *Thromb Haemost* 1993; 69:759.
- 9) Griffin JH, Evatt, Wideman C, Fernández JA.: Anticoagulant protein C pathway is defective in the majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; 82:1989, 1993.
- 10) Koster T, Rosendaal FR, Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM.: Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden thrombophilia study. *Lancet* 1993; 342:1503-1506.

- 11) Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A: El síndrome antifosfolípido. En López Borrasca A, Arocha-Pinango CL, Campos Guerra C, Parreira A, Pavlovsky S, Ruiz-Argüelles GJ, San Miguel JF (editores): *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*. Ediciones Universidad de Salamanca. Salamanca, España. 1992. pp. III. 637- III. 645
- 12) Dahlbäck B, Hildebrand B.: Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1994; 91:1396-1400.
- 13) Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, De Ronde H, Van del Valden PA, Reitsma PH.: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369:64-67.
- 14) Emmerich J, AlhencGelas M, Gandrille S, Fiessinger JN, Aiach M.: Une nouvelle cause de thrombophilie familiale, la résistance à l'action de la protéine C activée. *Press Med* 1994; 23:1285-1287.
- 15) Sun X, Evatt B, Griffin JH.: Blood coagulation factor Va abnormality associated with resistance to activated protein C in venous thrombophilia. *Blood* 1994; 83:3120-3125.
- 16) Tuddenham EGD.: Thrombophilia: the new factor is old factor V. *Lancet* 1994; 343:1515-1526.
- 17) Dahlbäck B.: Factor V gene mutation causing inherited resistance to activated protein C as a basis for venous thromboembolism. *J Intern Med* 1995; 237:221.
- 18) Dahlbäck B.: Inherited thrombophilia: Resistance to activated protein C as a pathogenic factor for venous thromboembolism. *Blood* 1995; 85:607-614.
- 19) Majerus PW.: Bad blood by mutation. *Nature* 1994; 369:14-15.
- 20) Rees DC, Cox M, Clegg JB.: World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346:1133-34.
- 21) Zöller B, Dahlbäck B.: Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* 1994; 343: 1536-1538.

- 22) Gandrille S, Greengard JS, Alhenc-Gelas M, Juhan-Vague I, Abgrall JF, Jude B, Griffin JH, Aiach M.: Incidence of activated protein C resistance caused by the ARG 506 GLN mutation in factor V in 113 unrelated symptomatic protein C deficient patients. *Blood* 1995; 86:219-224.
- 23) Zoller B, Berntsdotter A, García-de-Frutos P, Dahlbäck B.: Resistance to activated protein C as and additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood* 1995; 85:3518-3523.
- 24) Rosendaal FR, Bertina RM, Reitsma PH.: Evaluation of activated protein C resistance in stored plasma. *Lancet* 1994; 343:1289.
- 25) Svensson PJ, Dahlbäck B.: Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 300:517-522.
- 26) Pötsch B, Kawamura H, Preissner KT, Schmidt M, Seelig C, Müller-Berghaus G.: Acquired protein C dysfunction but not decreased activity of thrombomodulin is a possible marker of thrombophilia in patients with lupus anticoagulant. *J Lab Clin Med* 1995; 125:56-65.
- 27) Key NS.: Toward an understanding of the pathophysiological mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *J Lab Clin Med* 1995; 125:16-17.
- 28) Cooper PC, Hampton KK, Abusenadah A, Malia RG, Preston FE, Greaves M.: Activated protein C resistance in antiphospholipid containing plasma: A possible mechanism of thrombosis. *Brit J Haematol* 1994; 86 (Suppl 1): 2.
- 29) Walker ID, Hickman GM, Stevenson C, McCall F.: High prevalence of APC resistance in the presence of antiphospholipids. *Brit J Haematol* 1994; 86 (Suppl 1): 2.
- 30) Borrel M, Sala N, de Castellarnau C, López S, Gari M, Fontcuberta J.: Immunoglobulin fractions isolated from patients with antiphospholipid antibodies prevent the inactivation of factor Va by activated protein C on human endothelial cells. *Thromb Haemost* 1992; 68:268-272.
- 31) Walker ID, Hickman GM, Stevenson C, McCall F.: High prevalence of aPC resistance in the presence of antiphospholipids. *Brit J Haematol* 1994; 86 (Suppl 1): 2.

- 32) Halbmayer WM, Haushofer A, Schon R, Fischer M.: Influence of lupus anticoagulants on a commercially available kit for APC-resistance. *Thromb Haemost* 1994; 72:645-646.
- 33) Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Gallaga JC, Cruz-Cruz D, Alarcón-Segovia D.: Investigación de la resistencia a la proteína C activada y de la mutación puntual tipo Leiden en el gen del factor V de la coagulación en pacientes con trombofilia. *Sangre* 1995; 40:250 (resumen).
- 34) Ruiz Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Alarcón-Segovia D, Ruiz-Argüelles A.: Activated protein C (aPC) resistance phenotype and genotype in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Blood* 1995; 86:924a. (resumen).
- 35) Matsuda J, Gohchi K, Tsukamoto M, Gotoh M, Saitoh N, Kawasugi K.: Resistance to activated protein C in systemic lupus erythematosus with antiphospholipid antibodies. *Eur J Haematol* 1994; 53:188.
- 36) Anglés A, Fernández P, Nicolau C, Piqueras J, Monasterio J, Quiroga D.: An approach to the significance of activated protein C resistance. *Haemost* 1994; 24 (Suppl 1): 152.
- 37) Cumming AM, Tait RC, Fildes S, Yoong A, Keeney S, Hay CRM.: Development of resistance to activated protein C during pregnancy. *Brit J Haematol* 1995; 90:725-727.
- 38) Olivieri O, Friso S, Manzato F, Guella A, Bernardi F, Lunghi B, Girelli D, Azzini M, Brocco G, Russo C, Corrocher R.: Resistance to activated protein C in healthy women taking oral contraceptives. *Brit J Haematol* 1995; 91:465-470.; Osterud B, Robertsen R, Asvang GB, Thijssen.: Resistance to activated protein in women using oral contraceptives. *Blood Coag Fibrinol* 1994; 5:853.
- 39) Cabiedes J, Cabral AR, Alarcón-Segovia D.: Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus patients associate more strongly with anti-beta 2 glycoprotein-I than with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1995; 49:109.
- 40) Matsuda J, Gotoh M, Gohchi K, Kawasugi K, Tsukamoto M, Saitoh N.: Resistance to activated protein C activity of an anti-B2-glycoprotein I antibody in the presence of B2-glycoprotein I. *Brit J Haematol*: 1995; 90:204-206.
- 41) Ruiz Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Alarcón-Segovia D, Ruiz-Argüelles A.: Activated protein C (aPC) resistance phenotype and genotype in patients with

primary antiphospholipid syndrome. *Rev Iberoamer Tromb Hemost* 1995; 8:61-62.

42) Alarcón-Segovia D, Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Ruiz-Argüelles A.: Factor V Leiden mutation in a patient with familial primary anti-phospholipid syndrome. *Enviado a publicación.*

43) Davies KA, Ireland H, Athanassiou P, Loizou S, Lane D, Waipport MJ.: Factor V Leiden mutation and venous thrombosis. *Lancet* 1995; 345:132.

44) Jorquera JI, Montoro JM, Fernández MA, Aznar JA, Aznar J.: Modified test for activated protein C resistance. *Lancet* 1994; 344: 1162-1163

45) De la Peña, Izaguirre R, Montante A, Guadalajara F, Bañales JL, Cuevas H.: Resistencia a la proteína C activada en enfermos con trombosis venosa y/o arterial. Estudio preliminar. *Rev Iberoamer Tromb Hemost* 1995; 8:104-105.

46) Césarman-Maus G.: Actualidades en los sistemas fibrinolítico y de proteínas C y S. *Rev Invest Clin Méx* 1995; 47 (Suppl 1): 16-19.

47) Dahlbäck B.: Activated protein C resistance caused by a factor V gene mutation as a major basis for thrombosis. *Rev Iberoamer Tromb Hemost* 1995; 8:49-50.

48) Girolami A, Simioni P, Zanardi S, Scarano L, Girolami B.: Patients with APC resistance compared with those with other clotting inhibitor deficiencies show later onset of venous thrombosis during oral contraception. *Clin Appl Thrombosis / Hemostasis* 1995; 1:274-276.

49) Samama M, Trossaert M, Conard J, Horellou MH, Elalamy I, Samama MM.: Prevalence and patient profile in Activated Protein C Resistance. *Am J Clin Pathol* 1995; 104:450-454.