

Diagnóstico Molecular de Trombofilias

Juan Carlos Gómez de la Torre Pretell
Patología Clínica-Biología Molecular
Medicina de Enfermedades Infecciosas y Tropicales
Master of Business Administration
HCFAP-Laboratorios ROE
jgomez@labroe.com

Hemostasia

Integridad de:

1. Arbol vascular → Espasmo vascular
2. Plaquetas → Tapón plaquetar
3. Factores de la coagulación → Estabiliza coágulo
4. Factores de la fibrinólisis → Restaura circulación

TROMBOFILIA

1995 OMS + International Society of
Thrombosis and Hemostasis

Tendencia anormal a la trombosis se caracteriza por manifestaciones como la edad de inicio temprana, episodios recurrentes, antecedentes familiares notables, localizaciones poco habituales, migratorias o generalizadas y una gravedad desproporcionada respecto a todo estímulo identificado

TROMBOFILIA

FACTORES CONGÉNITOS

FACTORES ADQUIRIDOS

FACTORES PREDISPONENTES

TROMBOSIS VENOSA

Características:

Flujo sanguíneo lento
Trombo de fibrina y hematíes
Trombo rojo

Factores de riesgo:

Tratamiento hormonal
Cirugía
Inmovilidad
Cáncer
Fracturas óseas

Trombofilia

Inflamación
Disfunción
endotelial

Edad

TROMBOSIS ARTERIAL

Características:

Flujo sanguíneo rápido
Trombo de plaquetas (poca
fibrina y hematíes)
Trombo blanco

Factores de riesgo:

Tabaquismo
Hipertensión
Diabetes
Obesidad
Dislipemia

Edad

Trombofilia
Fracturas óseas
Cáncer

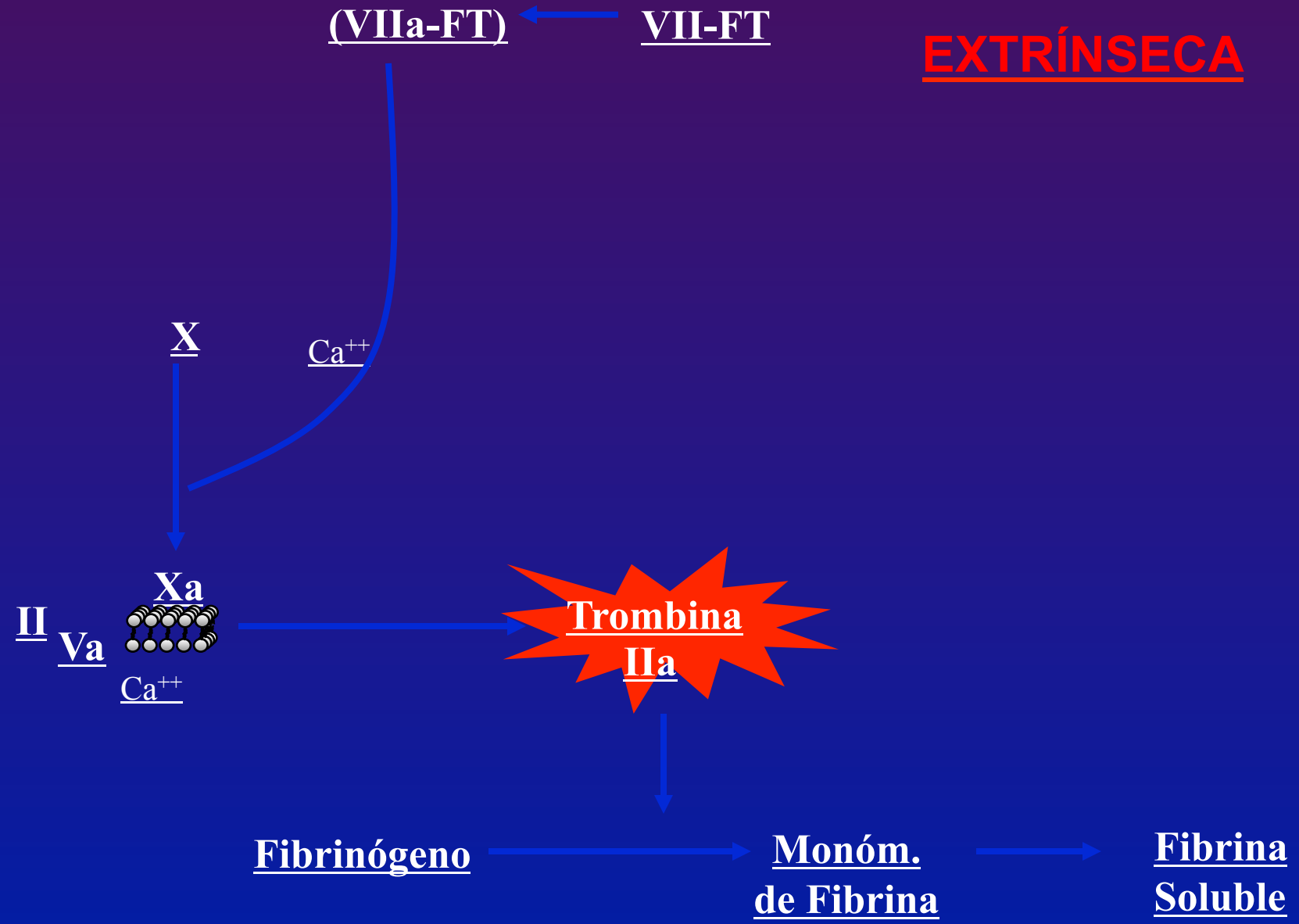
Dislipemia
Obesidad
Diabetes

Arterial ischemic stroke	Cerebral sinovenous thrombosis	Hemorrhagic stroke
Cardiac <ul style="list-style-type: none"> • Congenital • Acquired • Iatrogenic 	General <ul style="list-style-type: none"> • Dehydration • Infection • Fever • Hypoxic-ischemic injury • Post lumbar puncture 	Genetic vasculopathy
Hematologic disorders <ul style="list-style-type: none"> • Hemoglobinopathies • Thrombophilia • Iron deficiency anemia • Thrombocytopenia 	Hematologic disorders <ul style="list-style-type: none"> • Iron deficiency anemia • Sickle cell disease • Thalasemia • Autoimmune hemolytic anemia • Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria • Thrombophilia 	Hematologic disorders <ul style="list-style-type: none"> • Hemoglobinopathies • Platelet disorders • Coagulopathy • Hypofibrinogenemia
Infections <ul style="list-style-type: none"> • Meningitis 	Head and neck disorders <ul style="list-style-type: none"> • Infections • Injury • Hydrocephalus • Post intracranial surgery 	Trauma
Vasculitis <ul style="list-style-type: none"> • Primary • Secondary 	Autoimmune disorders	Hypertension <ul style="list-style-type: none"> • Congenital • Acquired
Vasculopathies	Malignancy	
Other <ul style="list-style-type: none"> • Trauma • Toxin/Drugs • Metabolic conditions 	Other <ul style="list-style-type: none"> • Cardiac disease • Renal disease • Drugs • Chromosomal disorders • Metabolic conditions 	

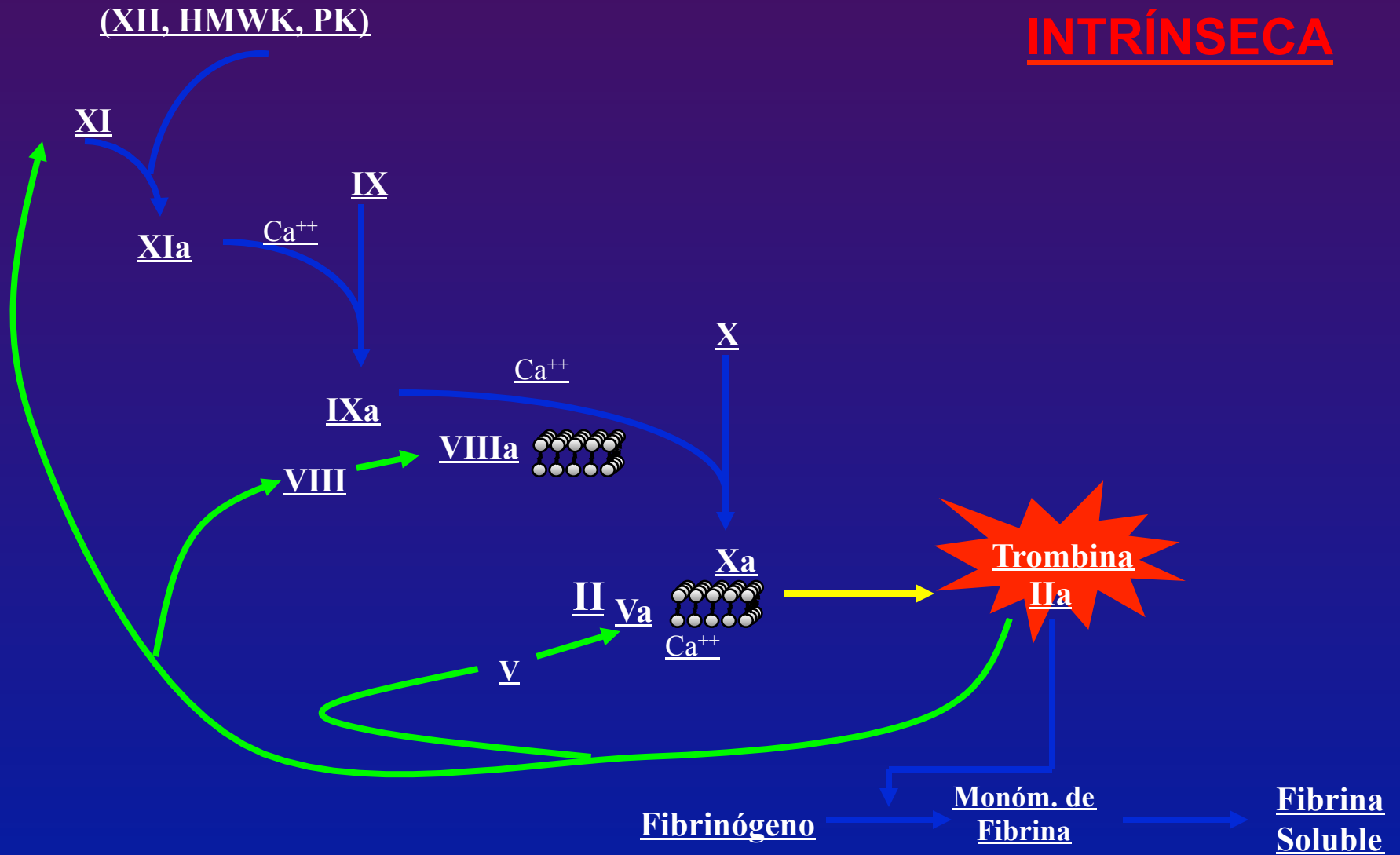
Factores Pro trombóticos Heredados

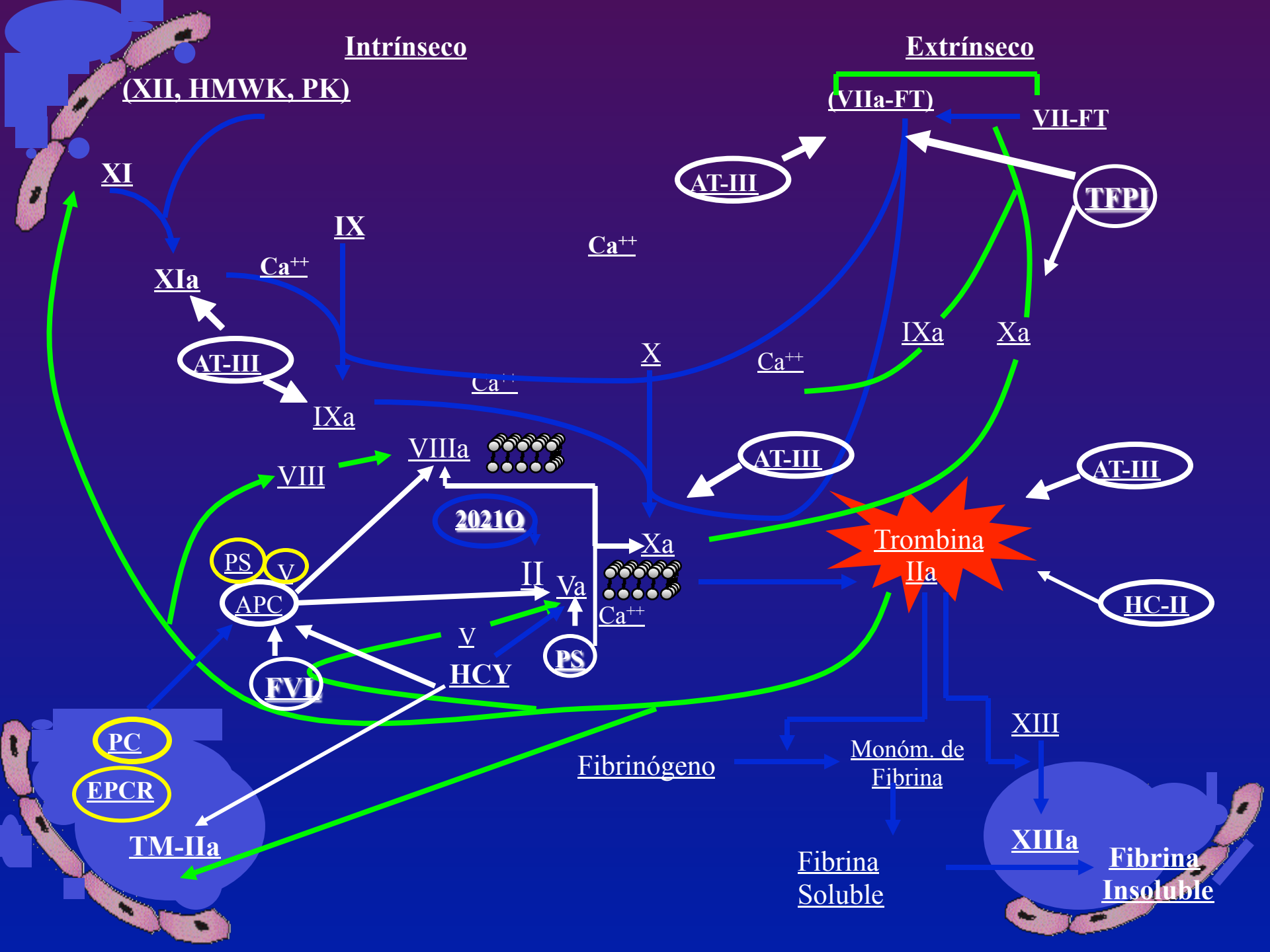
Prothrombotic factor	Pathophysiological relevance
Factor V Leiden	Single point mutation in FV gene causing resistance to proteolytic action of activated protein C, leading to increased thrombin generation.
Factor II G20210A	Mutation in 3' untranslated region of FII gene associated with slightly increased plasma FII levels resulting in hypercoagulable state.
Methylenetetra-hydrofolate reductase C677T	Mutation leading to mild decrease in enzymatic activity and increased homocysteine level which is prothrombotic.
Antithrombin deficiency	Multifunctional serpin that inhibits activated clotting enzymes (IIa, IXa, Xa, XIa) of the coagulation pathway.
Protein C deficiency	Vitamin K-dependent protein with anticoagulant properties (proteolytic degradation of FVa and FVIIIa).
Protein S deficiency	Cofactor of activated protein C, vitamin K-dependent.
Lipoprotein (a) elevation	Due to structural homology with plasminogen, it reduces plasmin generation by competing with plasminogen binding to fibrin.
Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism	Polymorphism associated with elevated PAI-1 levels and an increased risk of thromboembolic disease.
Factor XIII-A Val34Leu	Transglutaminase which mechanically stabilizes fibrin clot; in the presence of FXIII-A Leu34 the formed fibrin is more susceptible to fibrinolytic degradation.
Human platelet alloantigen-1 polymorphism	Leu33Pro polymorphism of the β_3 integrin gene which codes for the IIIa subunit of the GPIIb-IIIa platelet receptor involved in platelet adhesion and thrombus formation.

VÍA
EXTRÍNSECA



VÍA INTRÍNSECA





Trombofilias Hereditarias

Enfermedades	Mutaciones	Prevalencia	Manifestación		
			TEV	TEVR	TA
DAT	Gen <i>SERPINC1</i>	1/500 ~ 1/5.000	+	+	–
DPC	Gen de la proteína C	1/200 ~ 1/500	+	+	+/-
DPS	<i>PROS1</i>	0,03-2%	+	+	+/-
Resistencia a APC	FV Leiden (A506G); FVR2 (H1299R); FV Cambridge (R306T) y FV Hong Kong (R306G)	4-6%	+	+	–
Protrombina G20210A	Protrombina G20210A	2-4%	+	+/-	–

–: ausencia de evidencia; +: el riesgo aumenta; APC: proteína C activada; DAT: déficit de antitrombina; DPC: déficit de proteína C; DPS: déficit de proteína S; FV: factor V; TA: trombosis arterial; TEV: tromboembolia venosa; TEVR: tromboembolia venosa recurrente.

RESISTENCIA A LA PROTEÍNA C ACTIVADA (RPCa)

- Prevalencia 2-5% en la población caucásica
- En familia trombofílica 20-60%
- Congénita o adquirida
- Asociación con FVL, entre 80 a 95%
- En el embarazo fisiológicamente alterada
- Se puede utilizar como test de screening para la detección del FVL

RESISTENCIA A LA PROTEÍNA C ACTIVADA (RPCa)

NO SIRVE COMO MÉTODO DE SCREENING EN LAS SIGUIENTES SITUACIONES:

- Estudio bajo tratamiento anticoagulante
- Pacientes con anticoagulante lúpico positivo
- Familiares de pacientes que tienen FVL
- Mujeres con pérdida recurrente de embarazo
- Preeclampsia severa
- Retardo del crecimiento intrauterino

EN ÉSTOS CASOS REALIZAR ESTUDIO DE DNA PARA
FVL

MUTACIONES EN EL FV

1993, Dahlbäck (APCr).

1994, Bertina (APCR / 80 % FV Leiden).

Factor V Leiden

Mutación, sustitución de Adenina por Guanina, en el nucleótido 1691 del gen del factor V, lo que lleva a que la Arg506 sea sustituida por Glutamina, y se pierda un sitio de clivaje por APC.

Deficiente inhibición por APC.

Prevalencia:

Ausente en Asia, Africa y Australia.

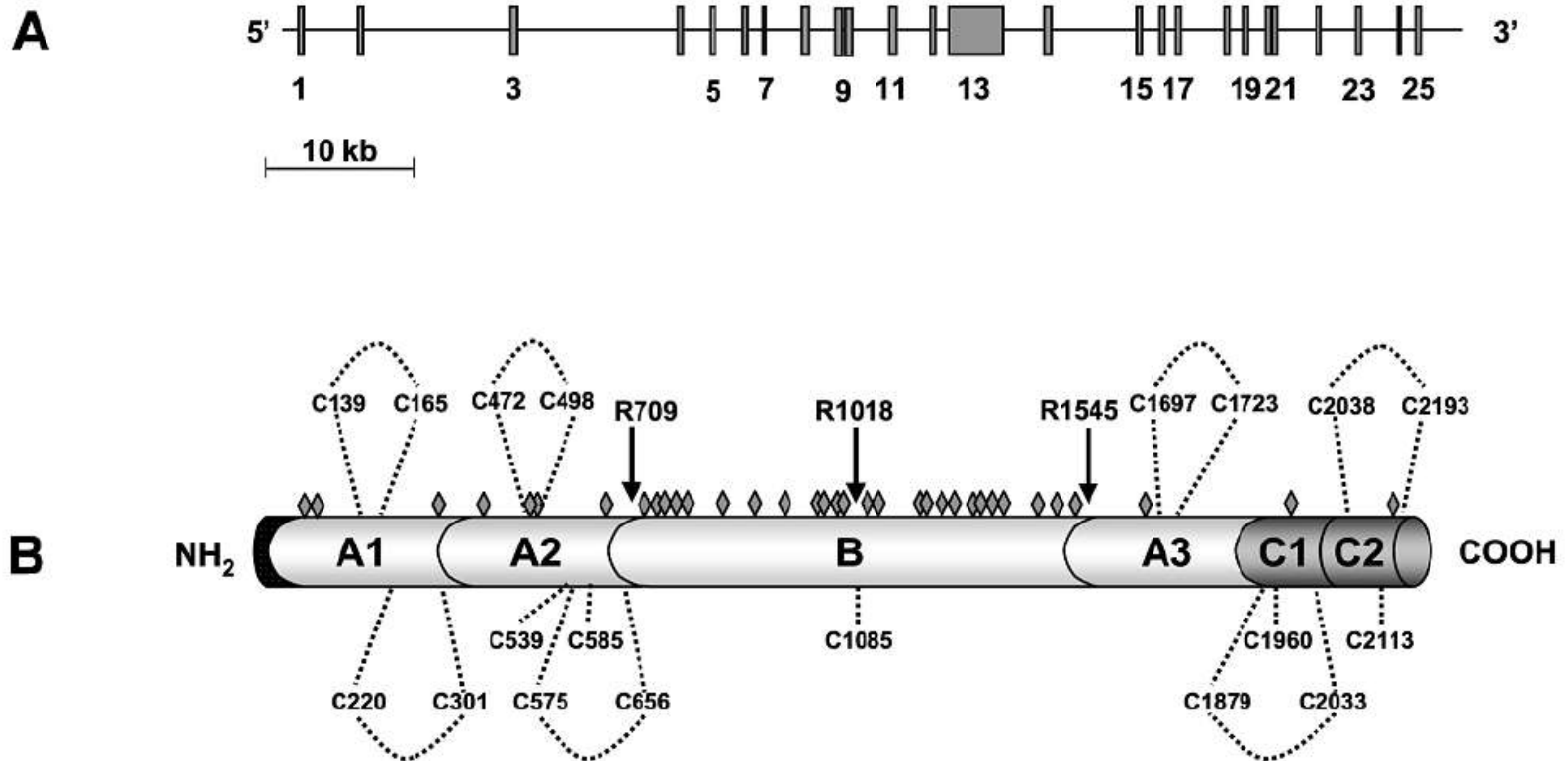
En población normal caucásica: 4-7 %

En familias trombofílicas 40 % (asociaciones con P20210 y deficiencias de PC y PS).

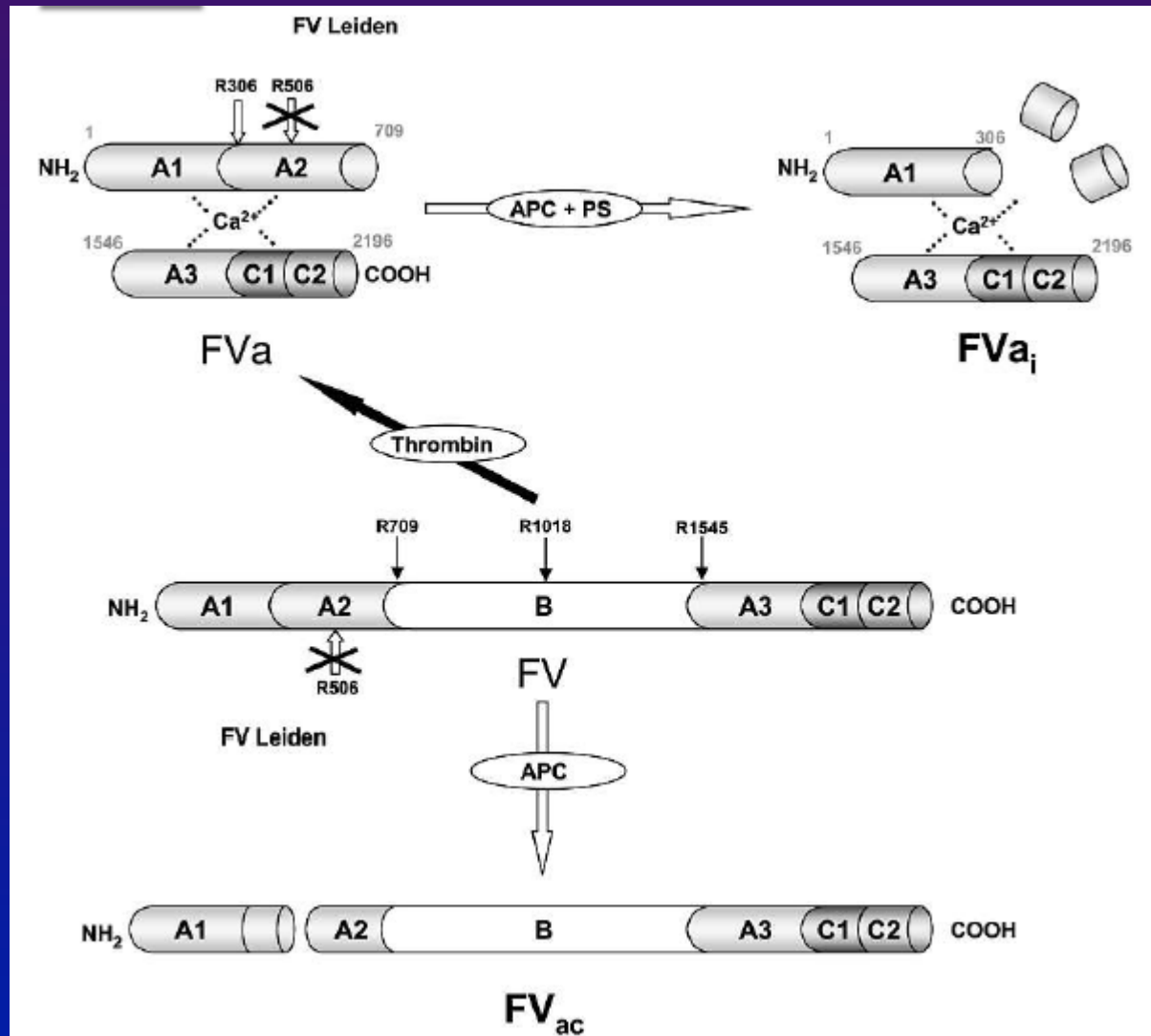
Heterocigota riesgo x 7.

Homocigota riesgo x 80.

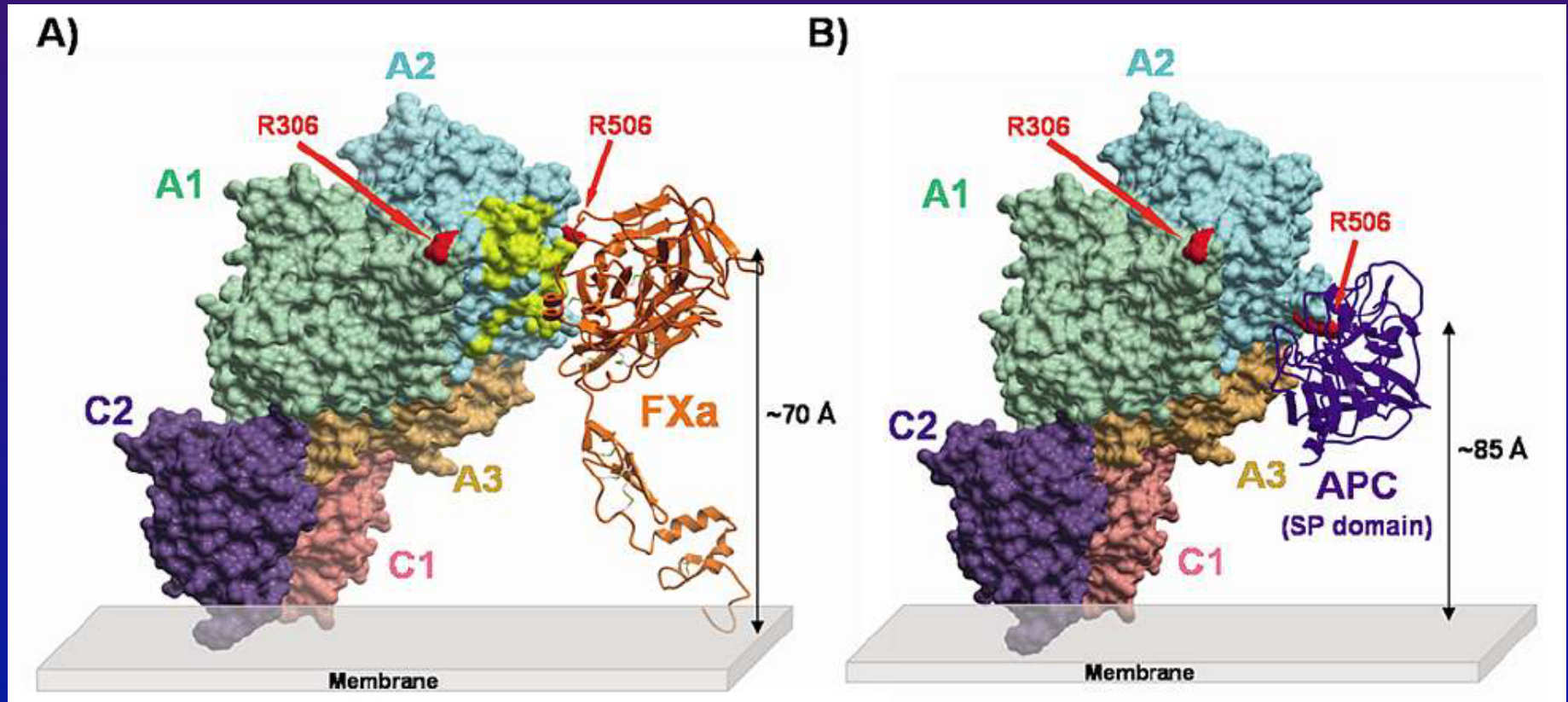
Gen y Molécula de FV



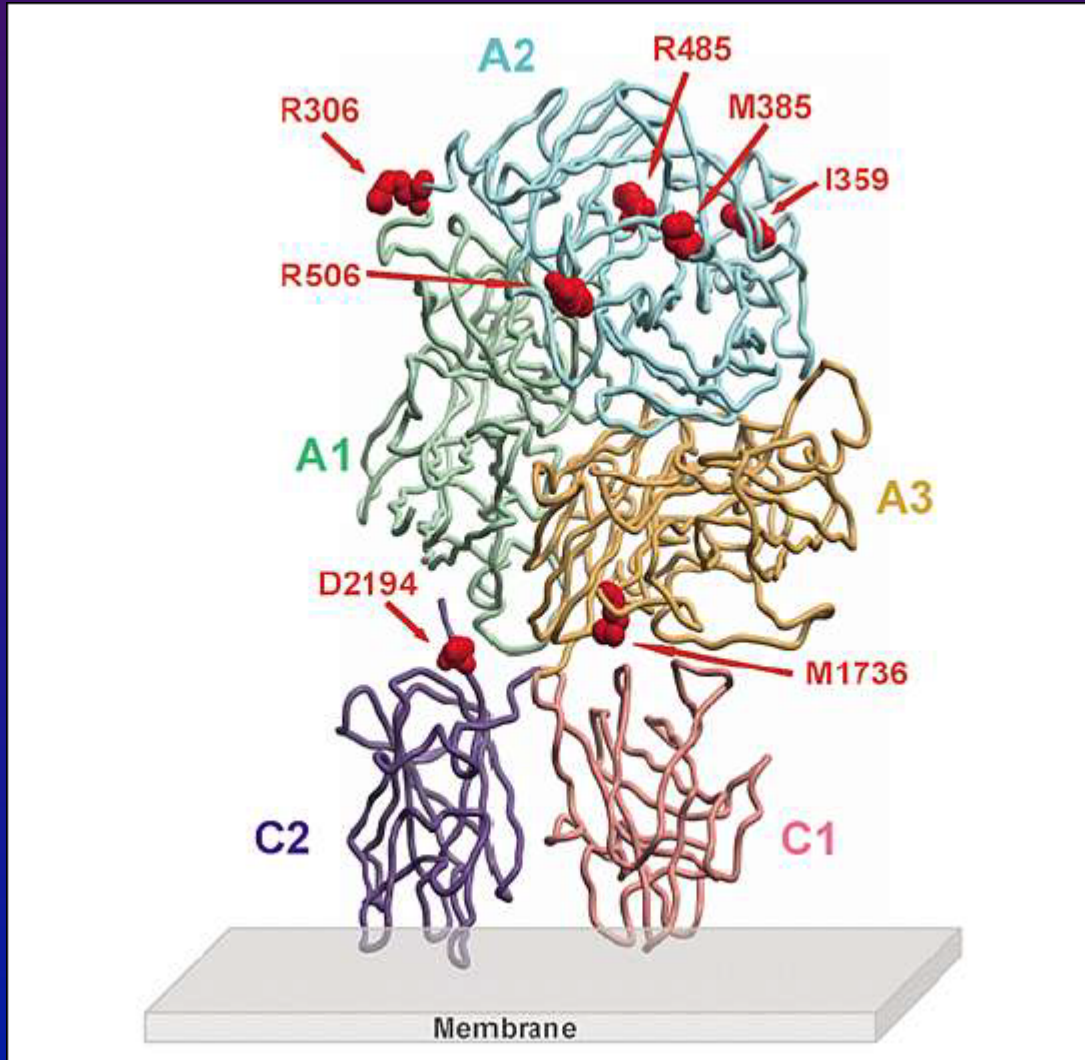
Actividad de Proteína C



Complejo FV-Fxa-FV-APC

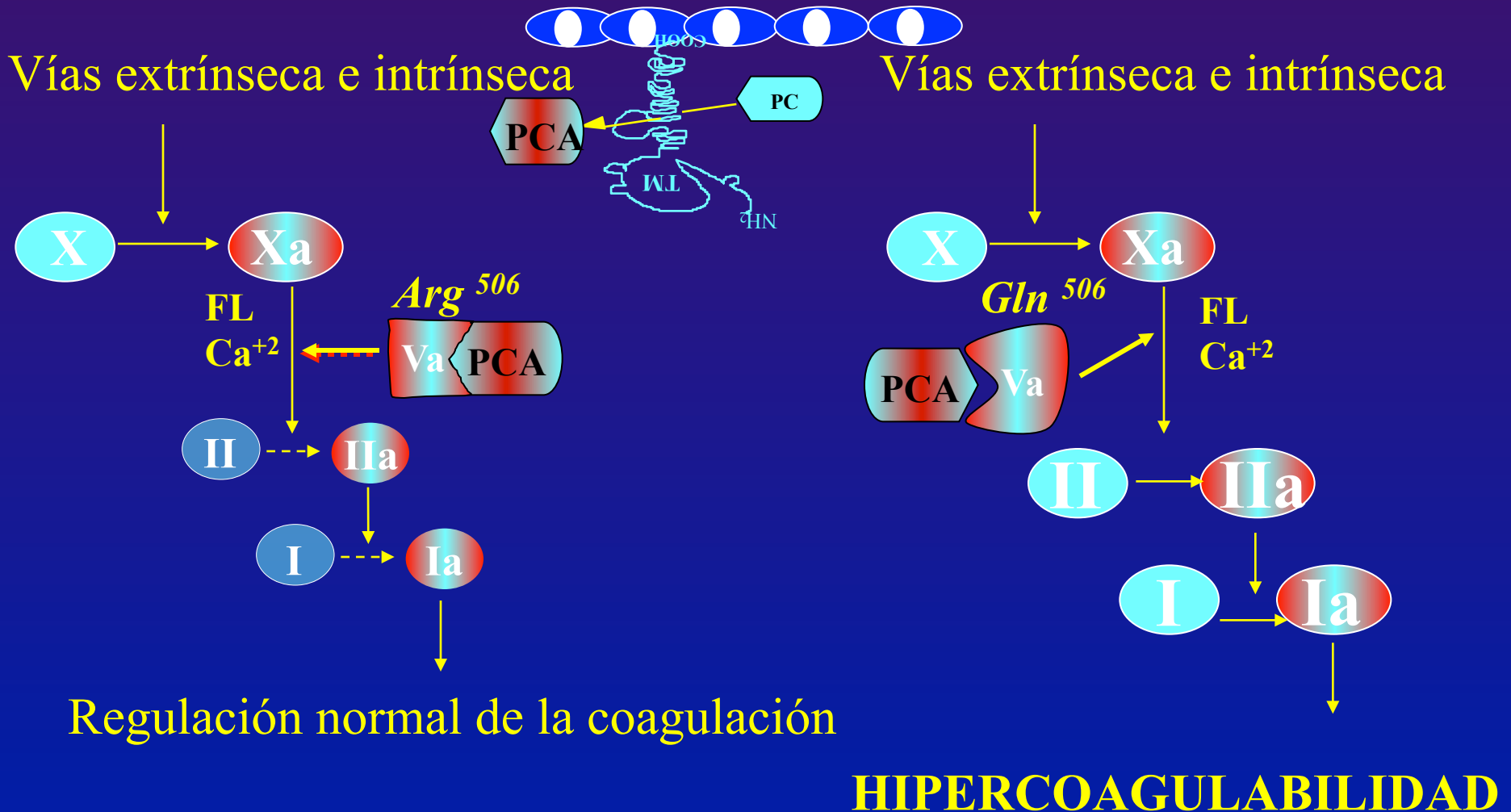


Mutaciones asociadas a rPCA



FV Leiden

Factor V Leiden: G1691 → A: Arg⁵⁰⁶ → Gln.



PROTROMBINA (G20210A)

Poort (1996).

Mutación en la región 3' no codificante del gen de la protrombina (20210 G→A) asociada con incrementos de FII

Prevalencia:

En población normal caucásica 1 - 3%.

Extremadamente raro en no caucásicos.

En familias trombofílicas 18 % (asociaciones con PS, FVL).

Aumento de riesgo trombótico venoso x 5

Protrombina G20210A

- Poort y cols. (1996)

- Gen de la protrombina
- Sujetos con H^a familiar de Trombosis



Genotipo 20210GG

Genotipo 20210AG

[Protrombina]
en plasma

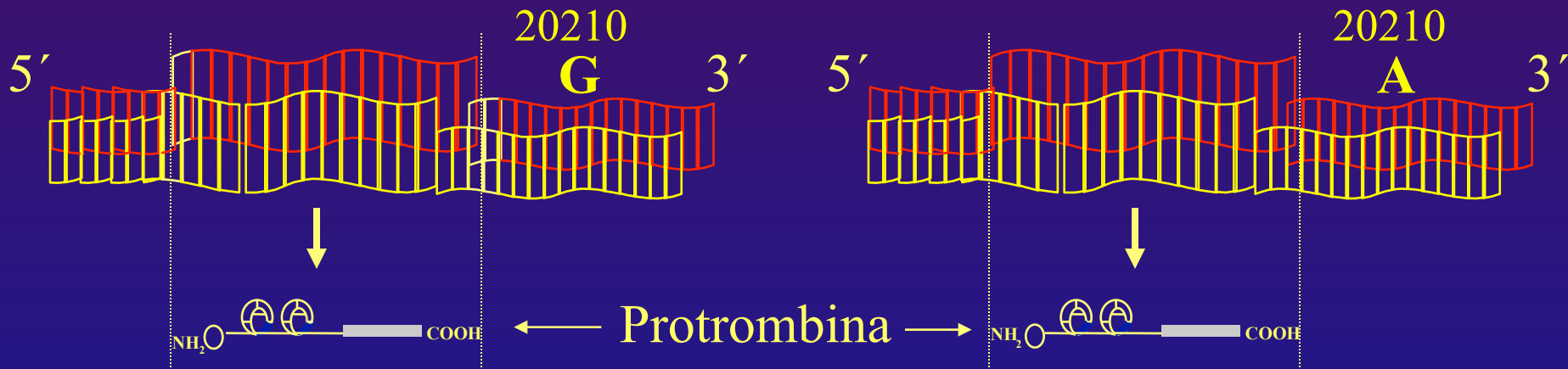
1,05 U/ml

1,32 U/ml

Coagulación normal

Riesgo de TEV

Protrombina G20210A



↑ [Protrombina en plasma] ?

- ↑ estabilidad RNAm ?
- ↑ eficacia en la traducción ?
- ????

METILEN-TETRA-HIDRO-FOLATO-REDUCTASA

MTHFR

- Prevalencia general: 45% heterocigotos
8% homocigotos
- Su asociación con trombosis venosa y pérdida de embarazo son cada vez más inconsistentes, teniendo relevancia el aumento de homocisteína independientemente de la mutación.
- No existen recomendaciones por consenso que indiquen que se debe de estudiar, salvo que exista hiperhomocisteinemia, para consejo familiar

HIPERHOMOCISTEINEMIA

**PRODUCTO INTERMEDIO DEL METABOLISMO DE
LA METIONINA**

-FACTOR DE RIESGO DE TROMBOSIS

- GENÉTICO: -Cistationina beta sintetasa

-Metilen tetra hidro folato reductasa (MTHFR)

- Metionina sintetasa

-ADQUIRIDO: déficit nutricional: - folico

- B12

- B6

insuficiencia renal

hipotiroidismo

neoplasias

drogas: metrotexate, fenitoína, carbamazepina

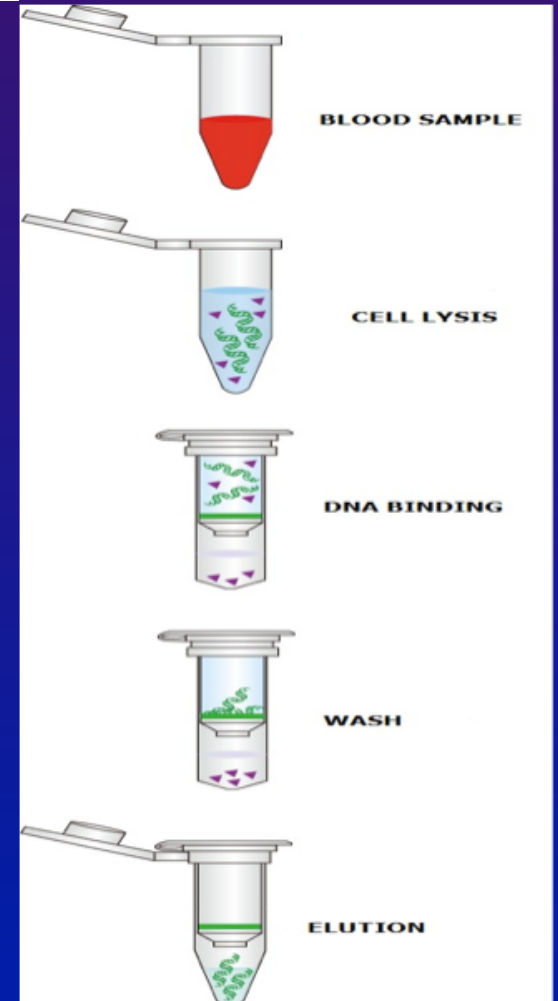
HIPERHOMOCISTEINEMIA

- **METABOLITO QUE PUEDE ACTUAR COMO PROCOAGULANTE**
- **ACTIVA EL FV**
- **INTERFIERE CON LA ACTIVACIÓN DE LA PC**
- **SUPRIME EXPRESIÓN DE TM**
- **INHIBE tPA**

Como se detectan molecularmente

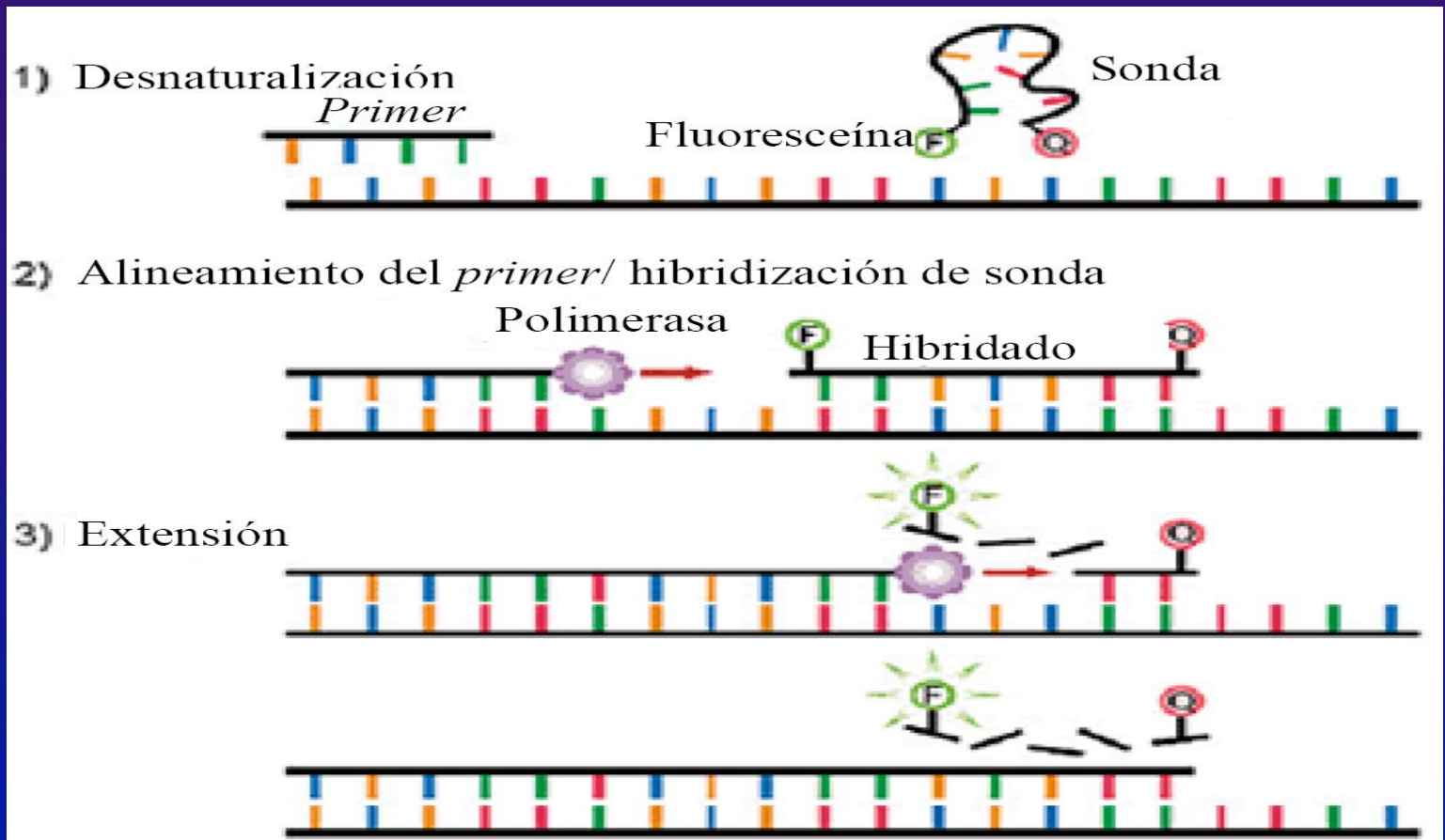


TUBO CON EDTA Y EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO



PCR en Tiempo Real

- Fundamento:



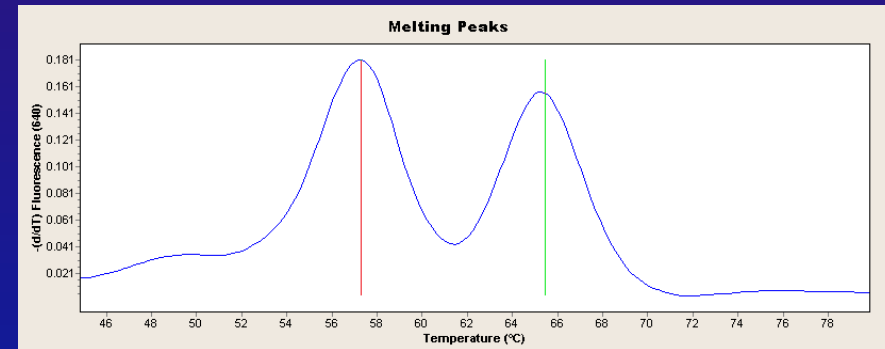
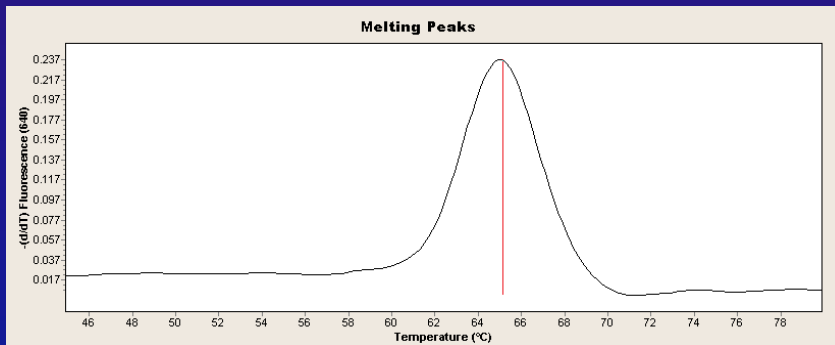
Equipo Light Cyclers 2.0

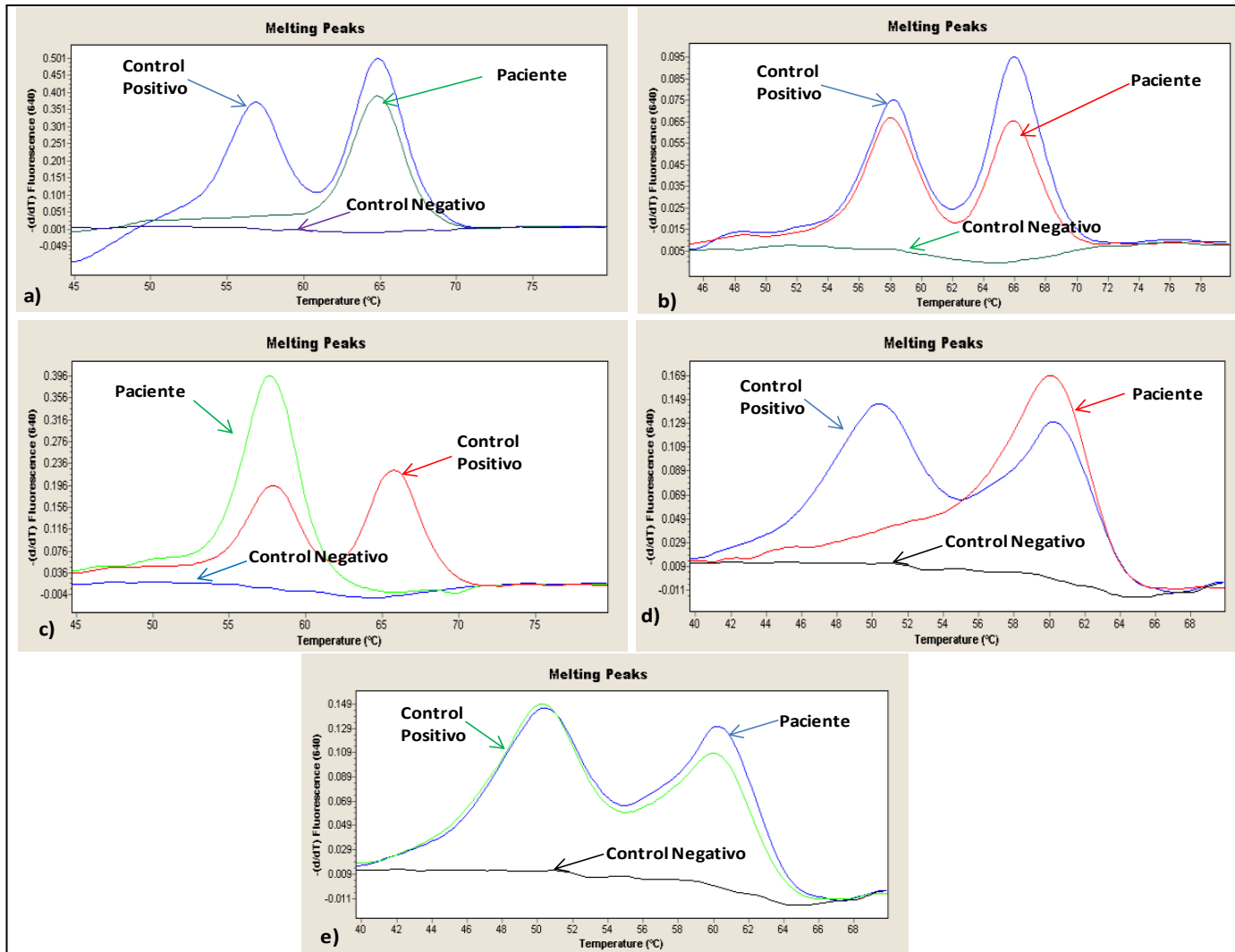


FVL

**FVL Homocigoto
normal**

**FVL Heterocigoto
mutante**



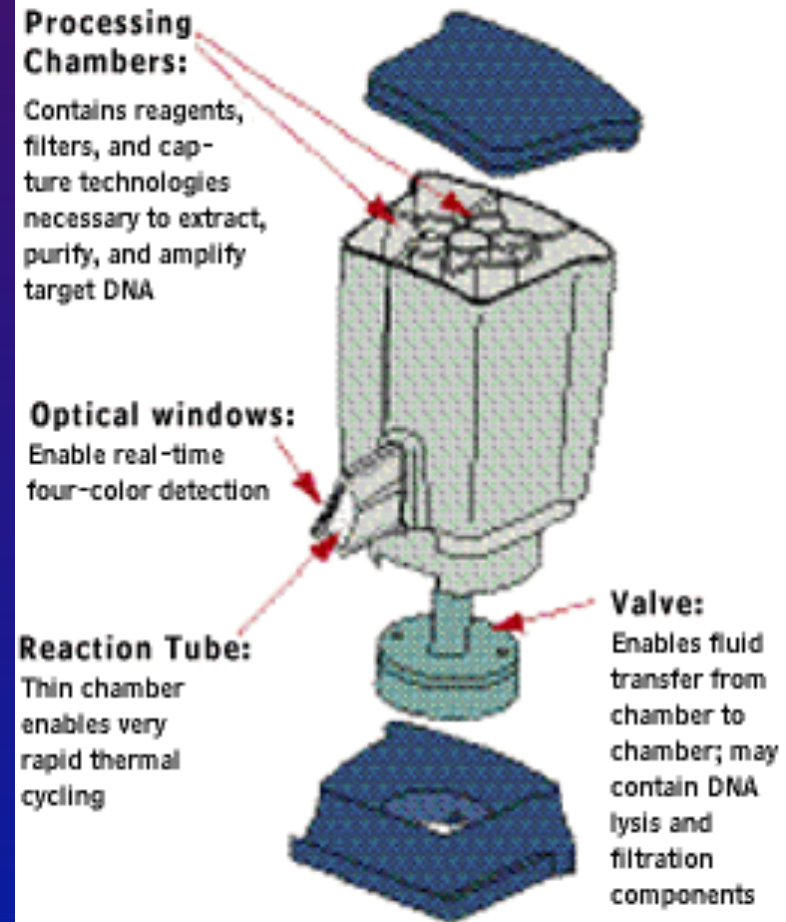


- a) Curva de paciente negativo para la Mutación de Factor V Leiden(G1691A).
- b) Curva de paciente Heterocigoto para la Mutación de Factor V Leiden(G1691A).
- c) Curva de paciente Homocigoto para la Mutación de Factor V Leiden(G1691A).
- d) Curva de paciente negativo para la Mutación de Factor II Protrombina (G20210A).
- e) Curva de paciente Heterocigoto para la Mutación de Factor II Protrombina (G20210A).

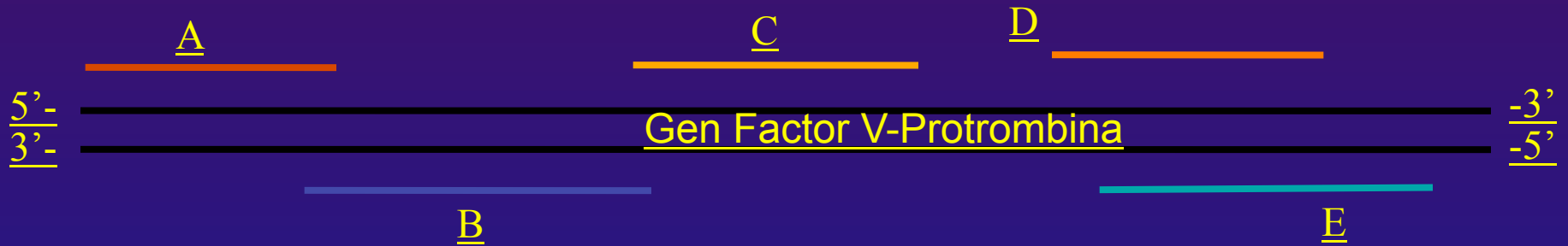
Equipo GeneXpert



Sistema Genexpert



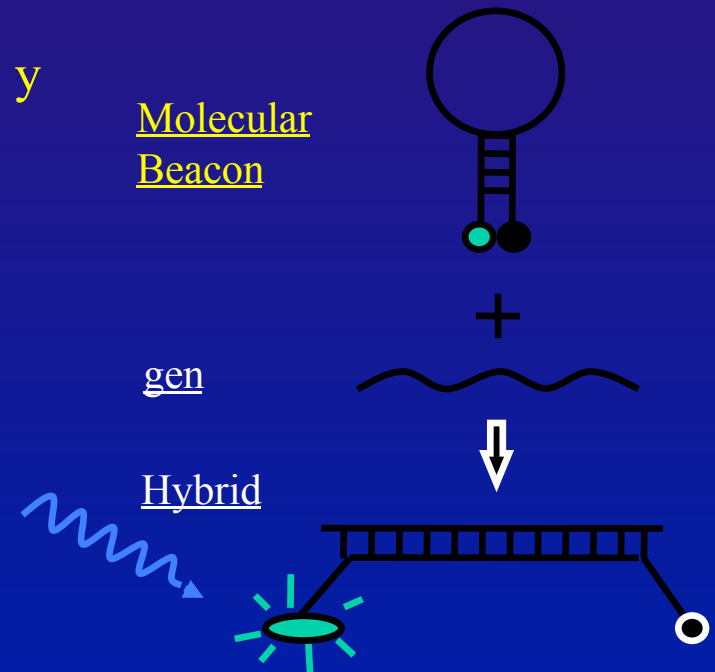
Xpert FV-FII; Ensayo de Molecular Beacon



Sondas específicas de mutaciones

Las sondas hibridizan con secuencias mutantes y no mutantes

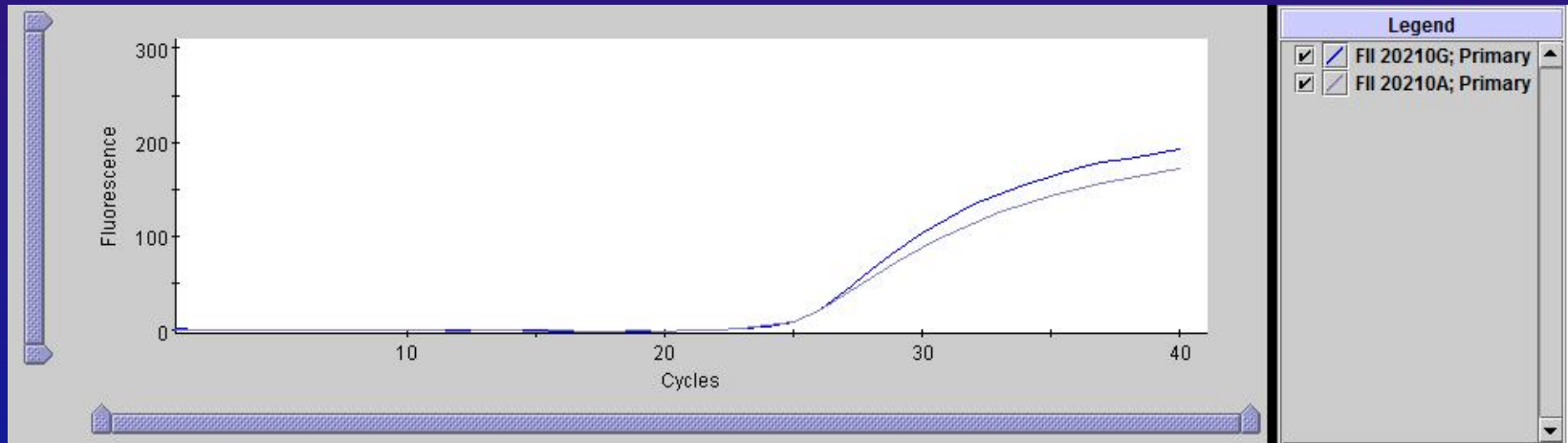
Detección simultánea de 4-6 fluorocromos



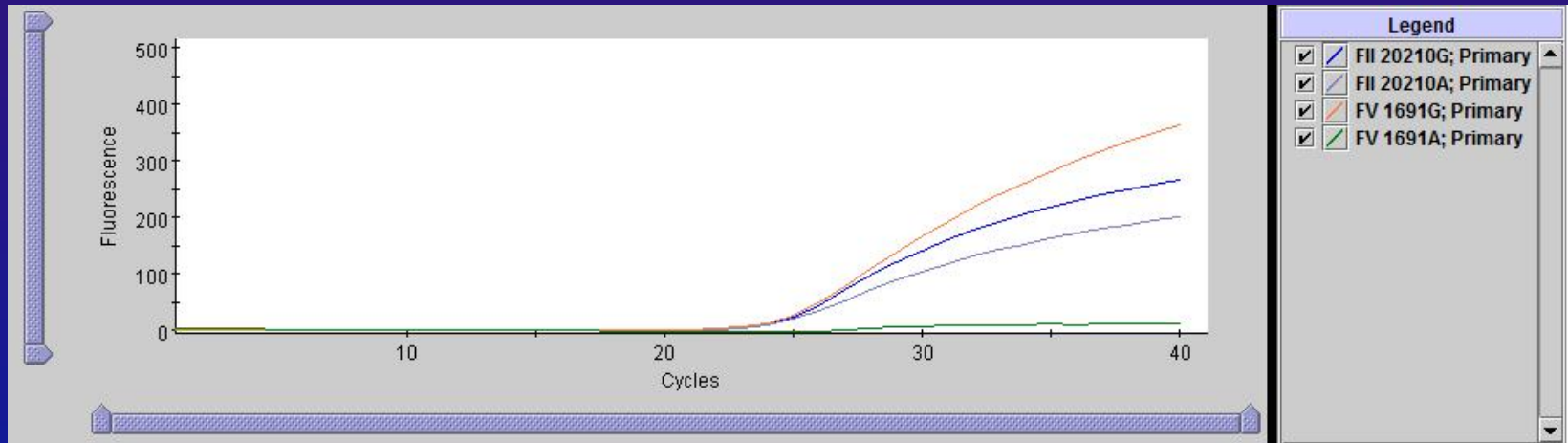
GeneXpert: Dentro del Laboratorio



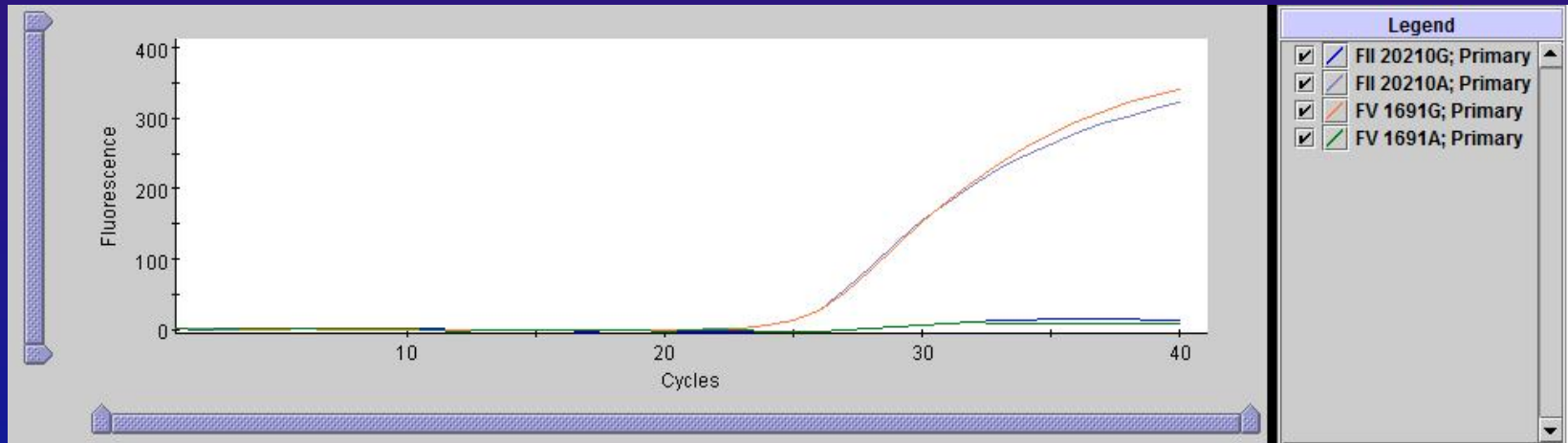
FII Heterocigoto Mutante



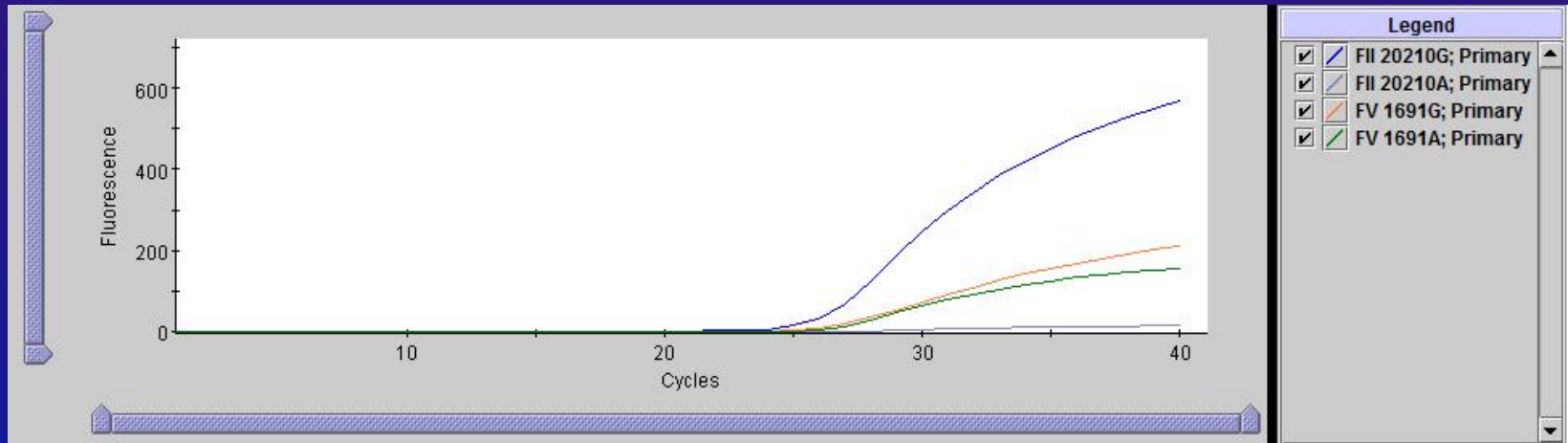
FII Heterocigoto mutante-FV Homocigoto normal



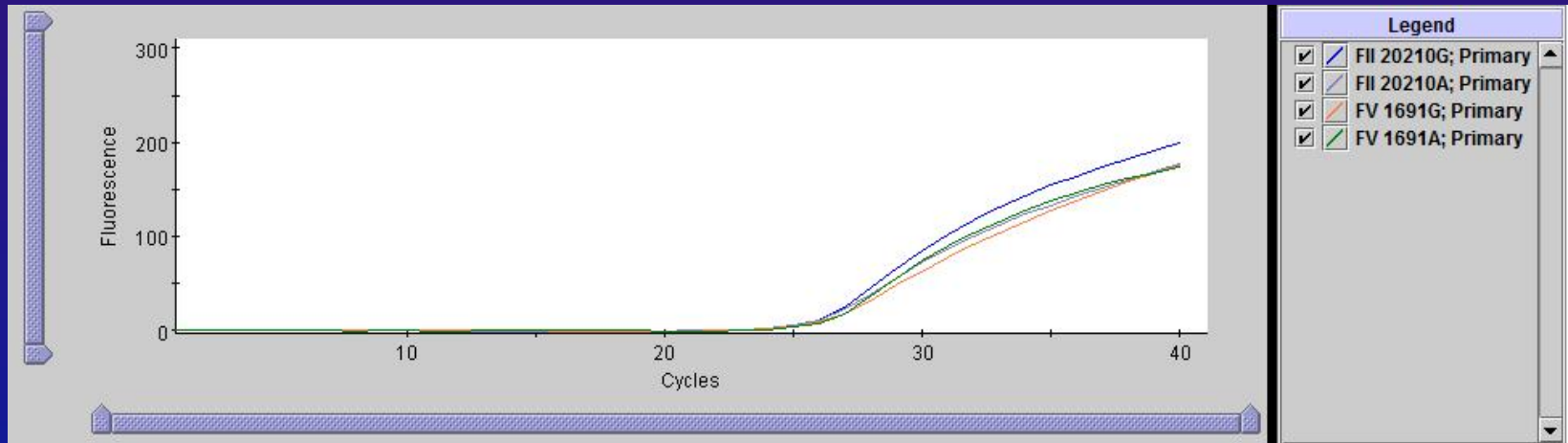
FII Homocigoto mutante-FV homocigoto normal



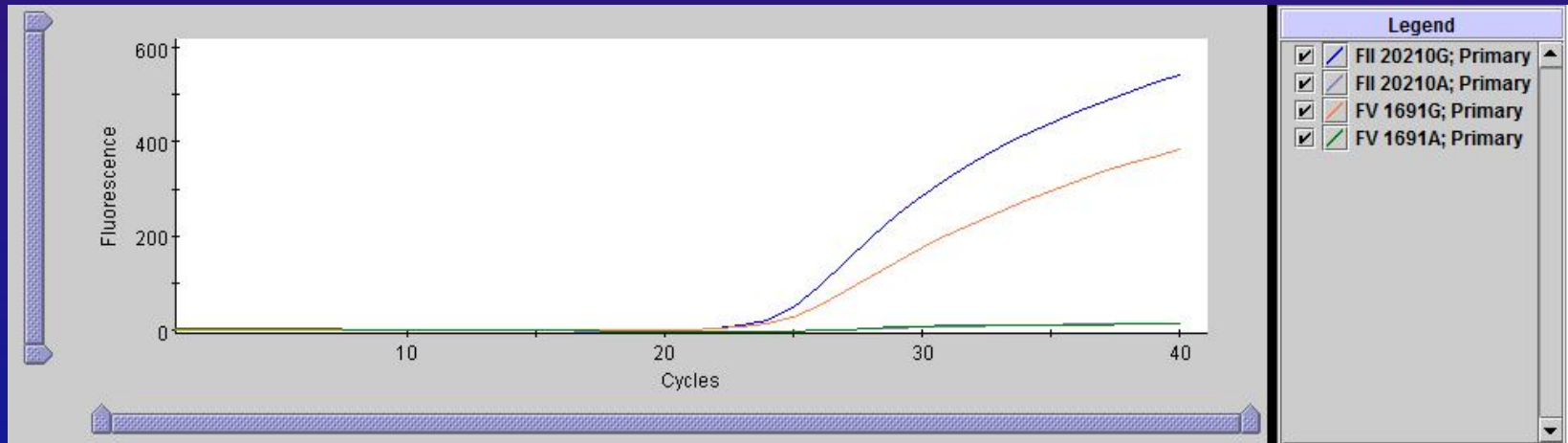
FV Heterocigoto mutante-FII homocigoto normal



FV-FII Heterocigoto mutante



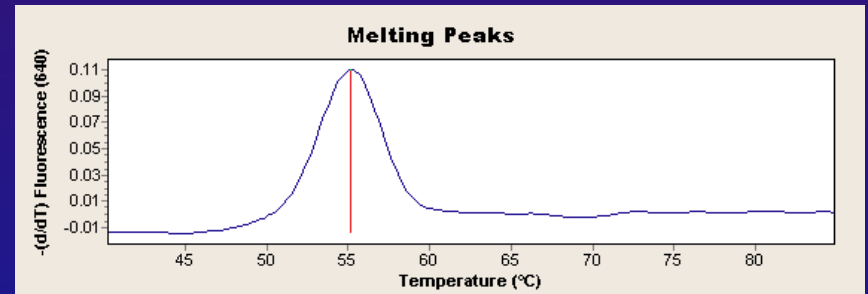
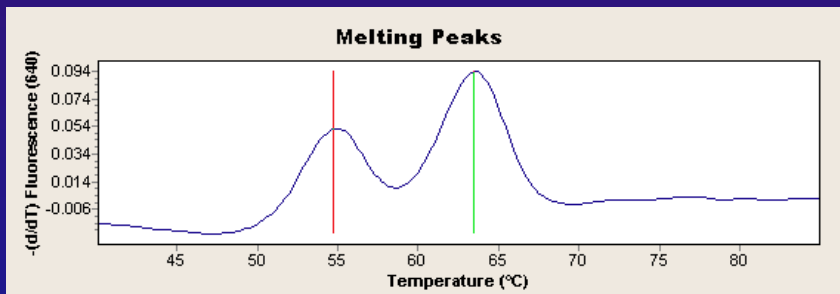
FV-FII Homocigoto normal



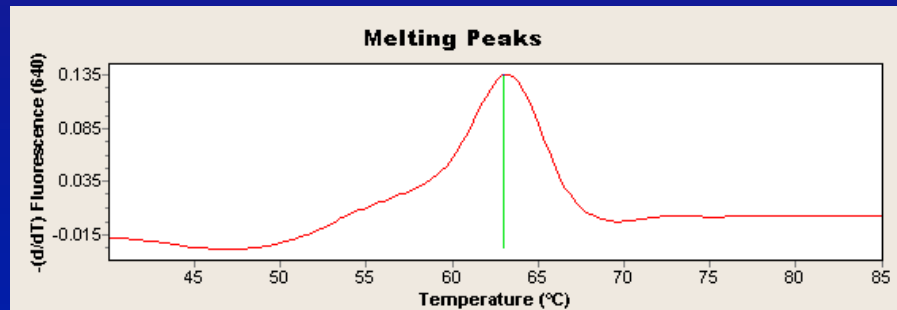
MTHFR C677T

MTHFR C677T
Heterocigoto mutante

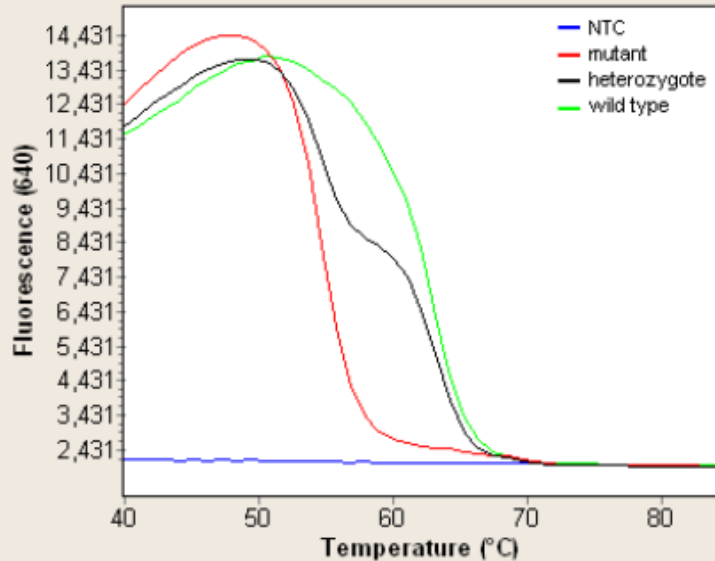
MTHFR C677T
Homocigoto mutante



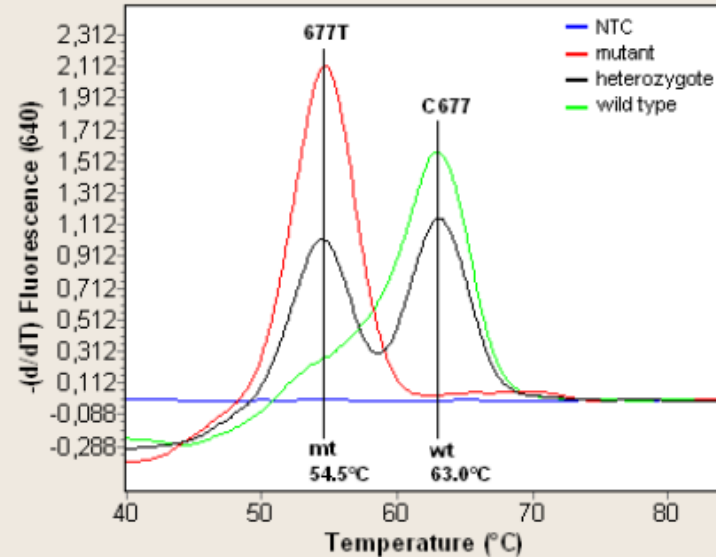
MTHFR C677T Homocigoto normal



Melting Curves



Melting Peaks



LightCycler®
2.0 Instrument

Roche Master:
Fast Start

Sample data for
MTHFR C677T

Channel 640

Genotype:

mutant homozygote
MTHFR 677T/T

heterozygote
MTHFR 677C/T

wild type homozygote
MTHFR 677T/T

Number of melting peaks (color)

1 (red)

2 (black)

1 (green)

Melting temperature of peaks

54.5°C

54.5°C and 63.0 °C

63.0°C

Temperature difference between peaks

8.5°C

Phenotype

hyperhomocysteinemia

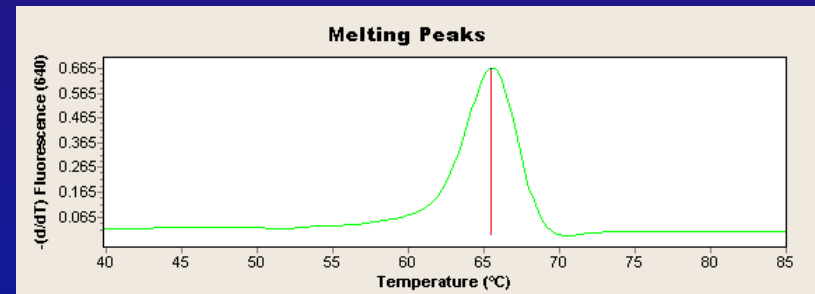
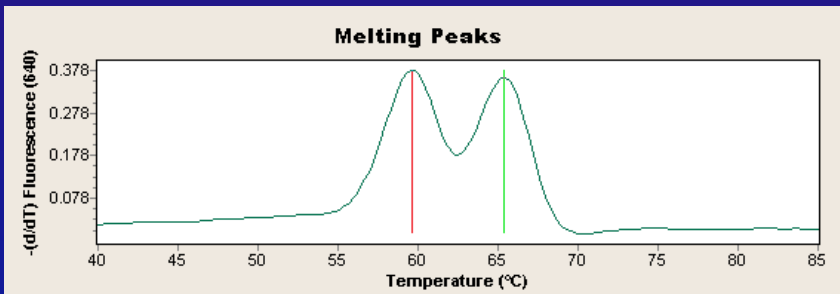
asymptomatic*¹

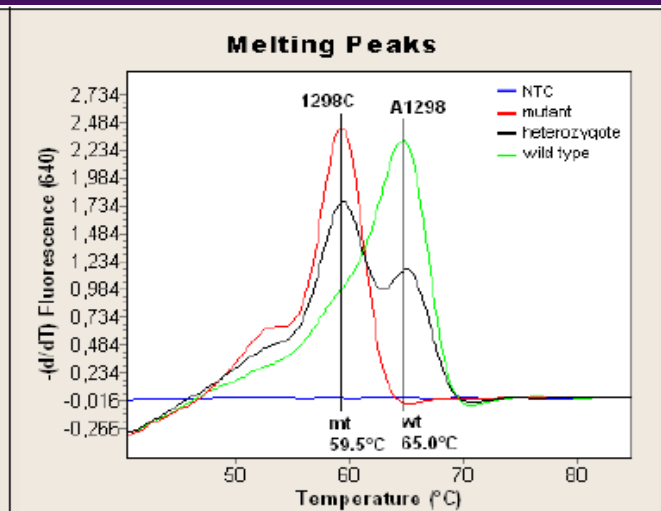
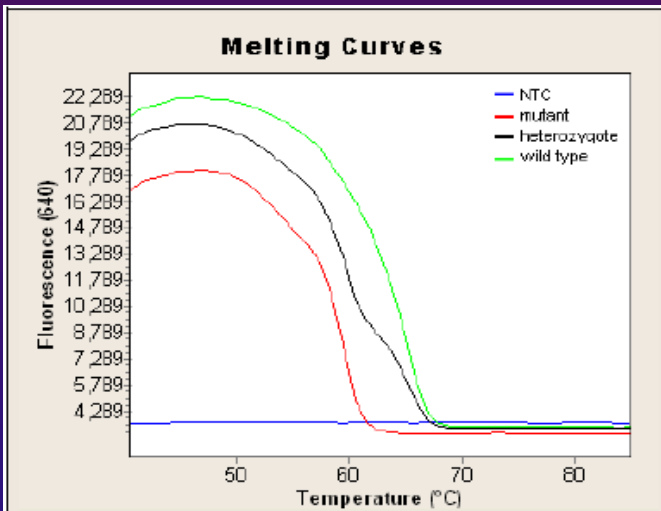
asymptomatic

MTHFR A1298C

MTHFR A1298C
Heterocigoto mutante

MTHFR A1298C
Homocigoto normal





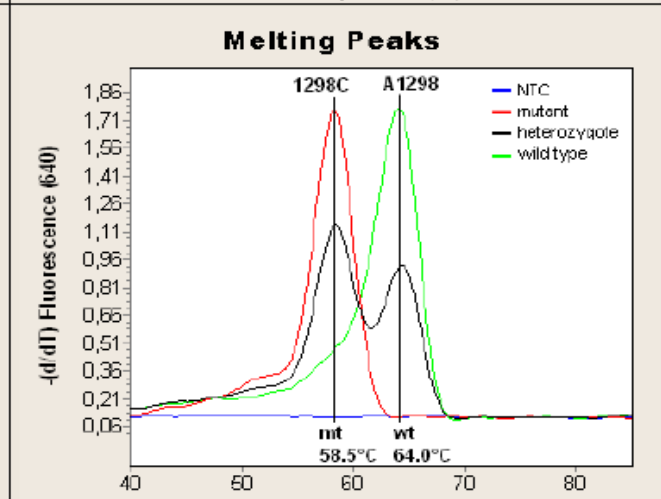
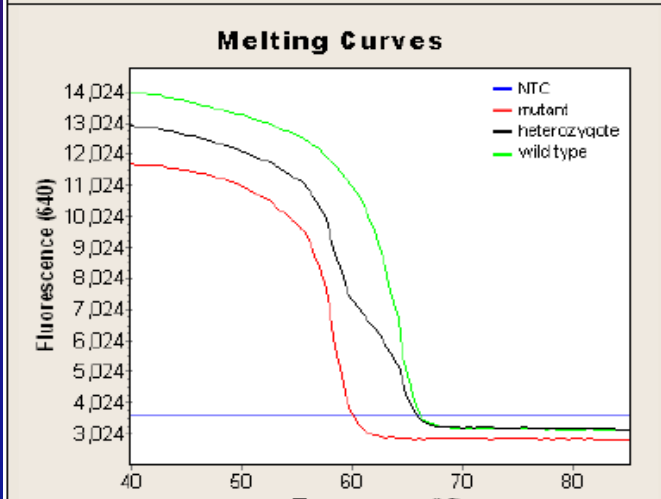
LightCycler® 2.0 Instrument

Roche Master: Fast Start

Sample data for *MTHFR* A1298C

Channel 640

Harmonized PCR Program



LightCycler® 2.0 Instrument

Roche Master: Fast Start

Sample data for *MTHFR* A1298C

Channel

Modified Melting Program

Genotype:	mutant homozygote <i>MTHFR</i> 1298C/C	heterozygote <i>MTHFR</i> 1298A/C	wild type homozygote <i>MTHFR</i> 1298A/A
Number of melting peaks (color)	1 (red)	2 (black)	1 (green)
Melting temperature of peaks	59.5°C	59.5°C and 65.0 °C	65.0°C
Temperature difference between peaks	---	5.5°C	---
Phenotype	hyperhomocysteinemia	asymptomatic* ¹	asymptomatic

Tiras de Thrombostrip® de pacientes con mutaciones en FVL mediante Real Time PCR en Lighy Cyclor de Roche

Codigo Interno	16	65	85	119	176	260	262	272	295	310	318	326	335	348	354
Linea Control															
Linea de Apmlficacion															
Alelos de FII															
Alleos de FVL															
Allelos de MTHFR															
Linea control															
Thrombostript															
FII	N/N	N/N	N/N	N/N	N/M	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N
FVL	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	M/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M
MTHFR	M/M	N/M	N/M	N/N	M/M	N/M	N/M	N/N	N/M	N/M	N/N	N/M	N/N	N/M	N/M
Light Cyclor															
FII	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
FVL	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	M/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M	N/M
Correlacion	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

Tiras de Thrombostrip® de muestras con alelos no mutantes en FVL y FII mediante Real Time PCR en Lighty Cycller de Roche

Codigo Interno	238	247	255	259	108	109	110	117	122	127	132	137	144	146	156	170	174	186	191	194	195	198	199	202	203	211	213	221	222	226	266	270	276	282
Linea Control																																		
Linea de Amplificacion																																		
Alelos de FII																																		
Alelos de FVL																																		
Alelos de MTHFR																																		
Linea control																																		
	Thrombostript																																	
FII	N/N																																	
FVL	N/N																																	
MTHFR	N/M																																	
	Light Cycller																																	
FII	N/N																																	
FVL	N/N																																	
Correlacion	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

Tiras de Thrombostrip® de muestras con alelos no mutantes en FVL y FII mediante Real Time PCR en Lighy Cyclor de Roche

Codigo Interno	286	288	289	293	312	313	316	322	323	330	331	334	345	349	358
Linea Control															
Linea de Amplificacion															
Alelos de FII															
Alleos de FVL															
Allelos de MTHFR															
Linea control															
	Thrombostript														
FII	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N
FVL	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N
MTHFR	N/M	N/M	M/N	M/N	N/N	N/M	N/N	M/M	N/N	M/N	M/N	N/M	N/M	N/M	N/N
	Light Cyclor														
FII	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N
FVL	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	N/N
Correlacion	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

**ES ÚTIL SOLICITAR PRUEBAS
DE TROMBOFILIA EN
POBLACIÓN GENERAL O
FAMILIARES CON TVP?**

Prevalencia de la trombofilia y riesgo relativo

	Antithrombin deficiency	Protein C deficiency	Protein S deficiency	Factor V Leiden	Prothrombin 20210A mutation	Lupus anticoagulant*	Anti-cardiolipin antibodies*	Anti-β2 GPI antibodies
Prevalence in the general population	0.02%	0.2%	0.03%-0.13%	3-7%	0.7%-4%	1%-8 %	5	3.4
Relative risk for a first venous thrombosis	5-10	4-6.5	1-10	3-5	2-3	3-10	0.7	2.4
Relative risk for recurrent venous thrombosis	1.9-2.6	1.4-1.8	1.0-1.4	1.4	1.4	2-6	1-6	
Relative risk for arterial thrombosis	No association	No consistent association	No consistent association	1.3	0.9	10	1.5-10	
Relative risk for pregnancy complications	1.3-3.6	1.3-3.6	1.3-3.6	1.0-2.6	0.9-1.3	No consistent data	No consistent data	

Prevalencia de la trombofilia y riesgo relativo

	Antithrombin deficiency	Protein C deficiency	Protein S deficiency	Factor V Leiden	Prothrombin 20210A mutation	Lupus anticoagulant*	Anti-cardiolipin antibodies*	Anti-β2 GPI antibodies
Prevalence in the general population	0.02%	0.2%	0.03%-0.13%	3-7%	0.7%-4%	1%-8 %	5	3.4
Relative risk for a first venous thrombosis	5-10	4-6.5	1-10	3-5	2-3	3-10	0.7	2.4
Relative risk for recurrent venous thrombosis	1.9-2.6	1.4-1.8	1.0-1.4	1.4	1.4	2-6	1-6	
Relative risk for arterial thrombosis	No association	No consistent association	No consistent association	1.3	0.9	10	1.5-10	
Relative risk for pregnancy complications	1.3-3.6	1.3-3.6	1.3-3.6	1.0-2.6	0.9-1.3	No consistent data	No consistent data	

Prevalencia de la trombofilia y riesgo relativo

	Antithrombin deficiency	Protein C deficiency	Protein S deficiency	Factor V Leiden	Prothrombin 20210A mutation	Lupus anticoagulant*	Anti-cardiolipin antibodies*	Anti-β2 GPI antibodies
Prevalence in the general population	0.02%	0.2%	0.03%-0.13%	3-7%	0.7%-4%	1%-8 %	5	3.4
Relative risk for a first venous thrombosis	5-10	4-6.5	1-10	3-5	2-3	3-10	0.7	2.4
Relative risk for recurrent venous thrombosis	1.9-2.6	1.4-1.8	1.0-1.4	1.4	1.4	2-6	1-6	
Relative risk for arterial thrombosis	No association	No consistent association	No consistent association	1.3	0.9	10	1.5-10	
Relative risk for pregnancy complications	1.3-3.6	1.3-3.6	1.3-3.6	1.0-2.6	0.9-1.3	No consistent data	No consistent data	

Prevalencia de la trombofilia y riesgo relativo

	Antithrombin deficiency	Protein C deficiency	Protein S deficiency	Factor V Leiden	Prothrombin 20210A mutation	Lupus anticoagulant*	Anti-cardiolipin antibodies*	Anti-β2 GPI antibodies
Prevalence in the general population	0.02%	0.2%	0.03%-0.13%	3-7%	0.7%-4%	1%-8 %	5	3.4
Relative risk for a first venous thrombosis	5-10	4-6.5	1-10	3-5	2-3	3-10	0.7	2.4
Relative risk for recurrent venous thrombosis	1.9-2.6	1.4-1.8	1.0-1.4	1.4	1.4	2-6	1-6	
Relative risk for arterial thrombosis	No association	No consistent association	No consistent association	1.3	0.9	10	1.5-10	
Relative risk for pregnancy complications	1.3-3.6	1.3-3.6	1.3-3.6	1.0-2.6	0.9-1.3	No consistent data	No consistent data	

Incidencia estimada de un primer episodio de TEV

	Antithrombin, protein C, or protein S deficiency	Factor V Leiden, heterozygous	Prothrombin 20210A mutation	Factor V Leiden, homozygous
Overall, %/year (95% CI)	1.5 (0.7-2.8)	0.5 (0.1-1.3)	0.4 (0.1-1.1)	1.8 (0.1-4.0)*
Surgery, trauma, or immobilization, %/episode (95% CI)†	8.1% (4.5-13.2)	1.8 (0.7-4.0)	1.6 (0.5-3.8)	
Pregnancy, %/pregnancy (95% CI)	4.1 (1.7-8.3)	2.1 (0.7-4.9)	2.3 (0.8-5.3)	16.3‡
During pregnancy, % (95% CI)	1.2 (0.3-4.2)	0.4 (0.1-2.4)	0.5 (0.1-2.6)	7.0‡
Postpartum period, % (95% CI)	3.0 (1.3-6.7)	1.7 (0.7-4.3)	1.9 (0.7-4.7)	9.3‡
Oral contraceptive use, %/year of use (95% CI)	4.3 (1.4-9.7)	0.5 (0.1-1.4)	0.2 (0.0-0.9)	

Individuos con un pariente sintomático de primer grado

Trombofilias en el embarazo

	Meta-análise	Trombose	Perda fetal recorrente	Morte fetal <i>in utero</i>	Pré-eclâmpsia	Restrição de crescimento fetal	Hematoma retroplacentário
FV Leiden (+/-)	Robertson, et al. ³ Rey, et al. ²	8,3 (5,4 -12,7) -	1,9 (1,0 -3,6) 2,0 (1,1 -3,6)	2,1 (1,1 -3,9) 3,3 (1,8 -5,8)	2,2 (1,5 -3,3) -	2,7 (0,6 -12,1) -	4,7 (1,1 -19,6) -
FV Leiden (+/+)	Robertson, et al. ³	34,4 (9,8 -120)	-	2,0 (0,4 -9,7)	1,9 (0,4 -7,9)	4,6 (0,2 -115,7)	8,4 (0,4 -171)
FII G20210A (+/-)	Robertson, et al. ³ Rey, et al. ²	6,8 (2,5 -18,8) -	2,7 (1,4 -5,3) 2,1 (1,3 -5,5)	2,7 (1,3 -5,5) 2,3 (1,1 -4,9)	2,5 (1,5 -4,2) -	2,9 (0,6 -13,7) -	7,7 (3,0 -19,8) -
FII G20210A (+/+)	Robertson, et al. ³	26,4 (1,2 -559)	-	-	-	-	-
Deficiência em antitrombina	Robertson, et al. ³ Rey, et al. ²	4,7 (1,3 -17) -	- 0,9 (0,2 -4,5)	7,6 (0,3 -196) -	3,9 (0,2 -97) -	- -	1,1 (0,1 -18) -
Deficiência em proteína C	Robertson, et al. ³ Rey, et al. ²	4,8 (2,2 -10,6) -	- 1,6 (0,2 -10,5)	3,1 (0,2 -38,5) -	5,2 (0,2 -102) -	- -	5,9 (0,2 -152) -
Deficiência em proteína S	Robertson, et al. ³ Rey, et al. ²	3,2 (1,5 -6,9) -	- 14,7 (1,0 -218)	20,1 (3,7 -109) -	2,8 (0,8 -10,6) -	- -	2,1 (0,5 -9,3) -

Thrombophilia	Risk on OCs per year, %	Risk difference per 100 women	No. not taking OCs to prevent 1 VTE	No. of female relatives to be tested
Antithrombin, protein C, or protein S deficiency				
Deficient relatives	4.3*	3.6	28	56
Nondeficient relatives	0.7*			
Factor V Leiden or prothrombin 20210A mutation				
Relatives with the mutation	0.5*	0.3	333	666
Relatives without the mutation	0.2*			
Family history of VTE				
General population, no family history	0.04†	0.03	3333	none
General population, positive family history	0.08†	0.06	1667	none

Thrombophilia	Risk of VTE per pregnancy, %*	Risk difference per 100 women	No. using prophylaxis to prevent 1 VTE†	No. of female relatives to be tested
Antithrombin, protein C, or protein S deficiency				
Deficient relatives	4.1‡	3.6	28	56
Nondeficient relatives	0.5‡			
Factor V Leiden or prothrombin 20210A mutation, heterozygous				
Relatives with the mutation	2.0‡	1.5	66	132
Relatives without the mutation	0.5‡			
Factor V Leiden or prothrombin 20210A mutation, homozygous				
Homozygous relatives	16.0	15.5	6	24
Relatives without the mutation	0.5			
Family history of VTE				
General population, no family history	0.5§	n/a	200	none
General population, positive family history	1.0§	0.5	200	none

Inherited thrombophilia	Population	Cases	Controls	OR (95% CI)	Reference
Factor V Leiden	English	6/50	4/77	2.3 (0.6-8.6) ¹	Ganesan (20)
	Austrian	6/22	7/152	4.6 (1.2-17.2)	Zenz (21)
	Turkish	7/28	10/106	3.2 (1.1-9.3)	Akar (22)
	German	30/148	12/296	6.0 (3.0-12.1)	Nowak-Göttl (23)
	German	5/38	4/100	3.6 (0.9-14.9) ²	Sträter (24)
	Israeli	10/58	4/118	4.8 (1.4-16.5)	Kenet (25)
	Turkish	12/46	3/68	6.4 (1.7-23.0)	Akar (27)
	Argentinean	1/44	2/102	1.2 (0.2-13.2)	Bonduel (30)
	Portuguese	3/21	4/115	4.6 (0.9-22.4)	Barreirinho (31)
	Turkish	7/30	1/33	9.7 (1.1-452.3)	Duran (32)
	Croatian	4/33	2/112	7.6 (1.3-43.5)	Herak (34)
	Asian-Indian	8/54	10/58	0.9 (0.3-2.3) ^{1,4}	Biswas (35)
	Serbian	1/26	2/50	1.0 (0.1-11.1)	Djordjevic (36)
Meta-analysis	71/629	39/2004	1.2 (0.8-1.9)	Haywood (40)	
Meta-analysis	-/1014	-/2581	3.7 (2.8-4.8) ³	Kenet (41)	
Factor II G20210A	Austrian	1/17	1/98	3.9 (0.1-307.6)	Zenz (21)
	Turkish	5/28	3/106	7.4 (1.7-33.5)	Akar (22)
	German	9/148	4/296	4.7 (1.4-15.6)	Nowak-Göttl (23)
	Israeli	2/58	3/118	1.3 (0.2-8.2)	Kenet (25)
	Argentinean	0/44	1/102	/	Bonduel (30)
	Portuguese	2/21	1/115	11.8 (1.0-136.5)	Barreirinho (31)
	Croatian	1/33	4/112	1.0 (0.1-7.3)	Herak (34)
	Serbian	2/26	3/50	1.3 (0.2-8.4)	Djordjevic (36)
	Meta-analysis	35/550	15/1902	1.1 (0.5-2.3)	Haywood (40)
Meta-analysis	-/1059	-/2278	2.6 (1.7-4.1) ³	Kenet (41)	
Methylenetetra-hydrofolate reductase C677T (only TT homozygotes)	Turkish	4/28	6/106	3.9 (0.7-12.1)	Akar (22)
	German	30/148	12/296	2.6 (1.5-4.5)	Nowak-Göttl (23)
	Israeli	8/58	18/118	1.1 (0.4-2.7)	Kenet (25)
	Spanish	6/21	4/28	2.0 (0.5-8.0) ¹	Cardo (26)
	Turkish	4/46	6/68	1.0 (0.3-3.7) ¹	Akar (27)
	Portuguese	1/21	13/115	0.4 (0.1-3.0)	Barreirinho (31)
	Croatian	5/33	10/112	1.8 (0.6-5.8)	Herak (34)
	Asian-Indian	2/58	0/58	/ ⁴	Biswas (35)
	Serbian	1/26	5/50	0.4 (0.04-3.3)	Djordjevic (36)
	Polish	9/64	2/59	5.8 (1.0-42.7)	Zak (37)

La incidencia anual global de una primera TEV en los individuos con antitrombina, proteína C o deficiencia de proteína S es **1,5%**, mientras que este riesgo es **0,5%** para los portadores del factor V Leiden o la mutación 20210A de la protrombina.

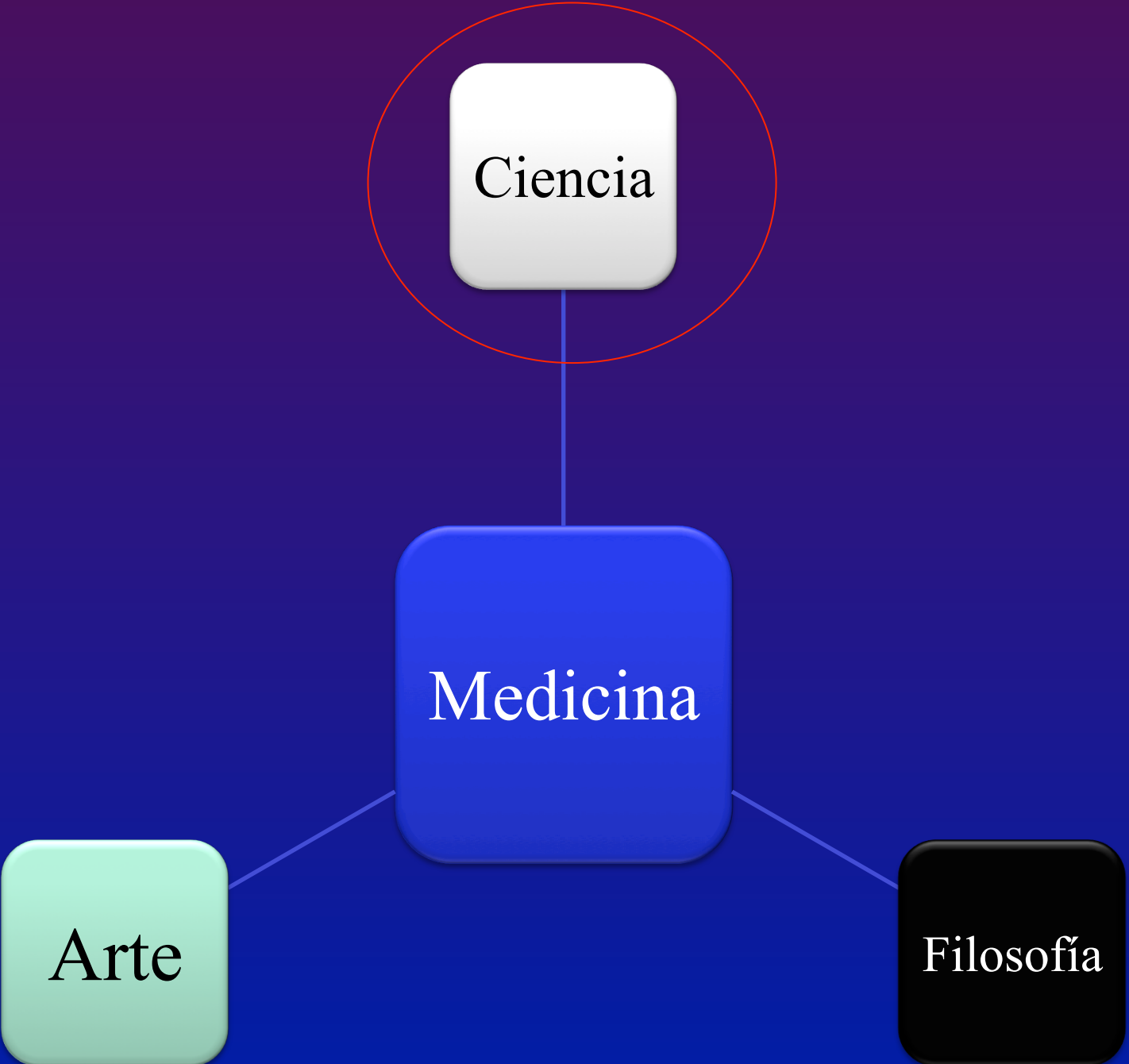
Riesgo de sangrado con anticoagulación:2%

Es útil solicitar pruebas de trombofilia pacientes con TVP?

Se recomienda realizar pruebas para trombofilia en:

- TEV no provocada antes de los 60 años de edad
- Antecedentes familiares de enfermedad tromboembólica
- Trombosis en sitios inusuales: venas cerebrales, venas visceral extremidades superiores, etc.
- Patología Obstétrica como: abortos involuntarios recurrentes, mortinatos o recién nacidos con alt. en la maduración
- Pruebas de laboratorio anormales sin aparente causas (prolongada TTPa, PCA)
- Necrosis de la piel después de la iniciación del tratamiento AVK.

**Un resultado Positivo cambia el
manejo?**



Ciencia

Medicina

Arte

Filosofía

Paper



Paciente



GRACIAS

_DEFICIENCIA DE ANTITROMBINA III (AT III)

Egeberg (1965).

Heterocigotas: 40-70 % del nivel normal de AT III.

228 mutaciones diferentes en el gen SERPINC1

Prevalencia:

en población normal 0,2 %

en familias trombofílicas 4,3 %

en pacientes con trombosis venosa 2-8%

Riesgo x 5, trombosis entre 15 y 30 años.

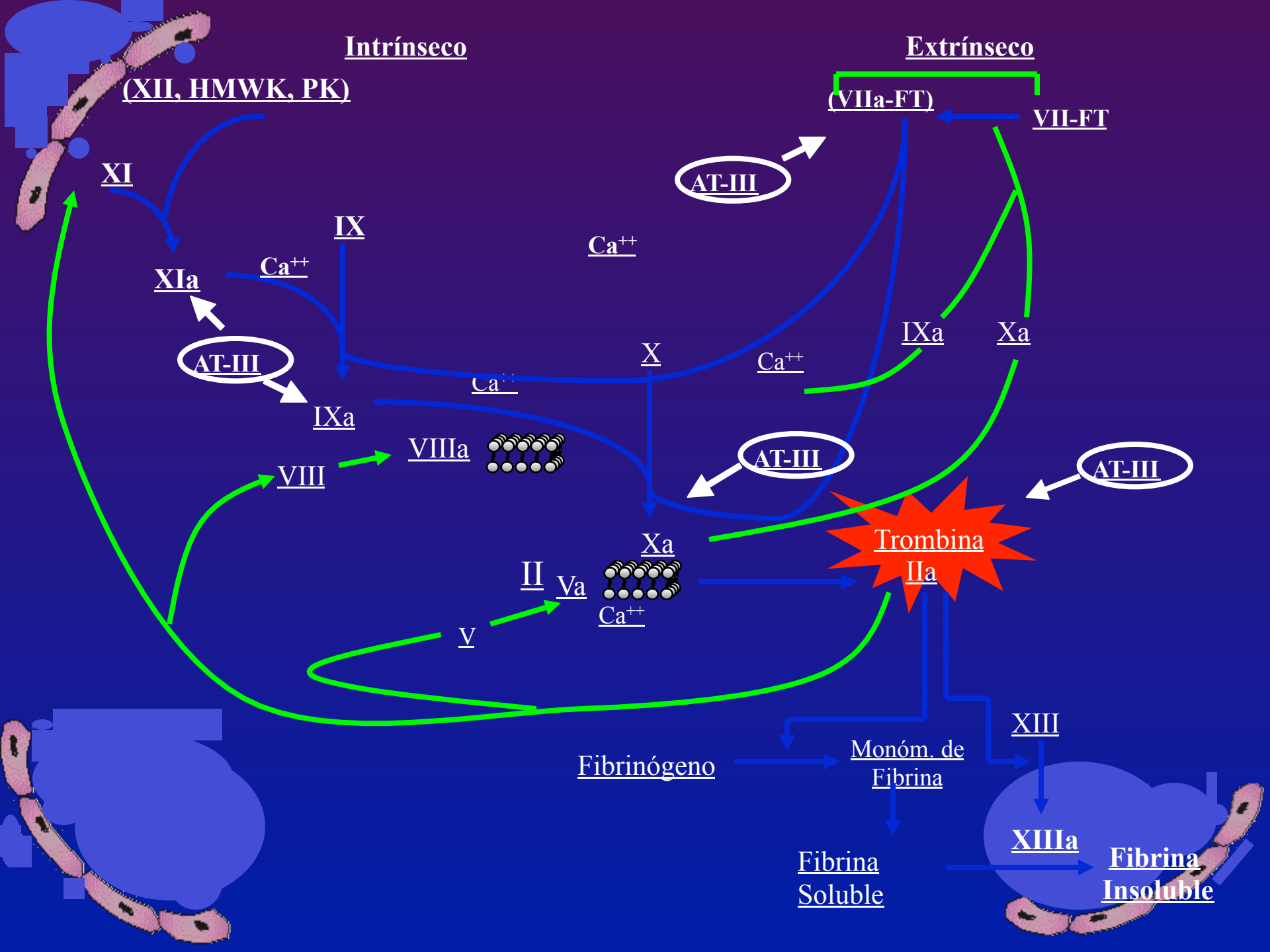
Asociación con trombosis arterial incierta

Antitrombina

- **Descrita en 1965**
- **Se denominó ATIII, se describieron seis**
- **El único que actúa como un inhibidor fisiológico de la trombina es la ATIII**
- **Actualmente:**
Antitrombina =Antitrombina (ATIII)

Antitrombina

- **Inactiva:**
 - **Trombina (II)**
 - **VIIa, XIIa, XIa, Xa y IXa**
- **La inactivación es incrementada por:**
 - **Heparán sulfato presente en la pared vascular**
 - **Tratamiento con heparina**



Antitrombina

- **Preferible no medir durante el episodio agudo**
- **Si valor normal, se excluye deficiencia**
- **Idealmente medir tres meses después del episodio agudo**
- **Medir al menos 5 días después de haber discontinuada la heparina**

Antitrombina

Deficiencia Adquirida

- **Coagulopatía de consumo:**
 - CID, preeclampsia.
- **Disfunción Hepática:**
 - Insuficiencia hepática aguda, cirrosis, prematuridad.
- **Enfermedad Renal:**
 - Síndrome nefrótico.
- **Pérdida Gastrointestinal:**
 - Enfermedad intestinal inflamatoria.
- **Medicamentos:**
 - Heparina, estrógenos-progestágenos, L-asparaginasa

Determinación en Laboratorio



ANTITROMBINA III-SIEMENS



Absorbancia a 405 nm es inversamente proporcional a la actividad de ATIII

VR: 80-112%; Linealidad de 0 a 140%

* Tosilglicil-L Polil-L-Arginil-5-amino-2 acido nitrobenzoico-isopropilamida

Proteína C

- El complejo trombina-trombomodulina activa la Proteína C
- La Proteína C activada inactiva el factor Va y VIIIa
- La proteína S funciona como su cofactor

VITAMINA K DEPENDIENTE

DEFICIENCIA DE PROTEÍNA C (PC)

Griffin (1980).

Mas de 160 mutaciones del gen de la proteína C

Herencia autosómica dominante.

Prevalencia:

en población normal	0,4 %
en familias trombofílicas	7 %

Heterocigota riesgo x 6,5 - trombosis a media edad (40a).

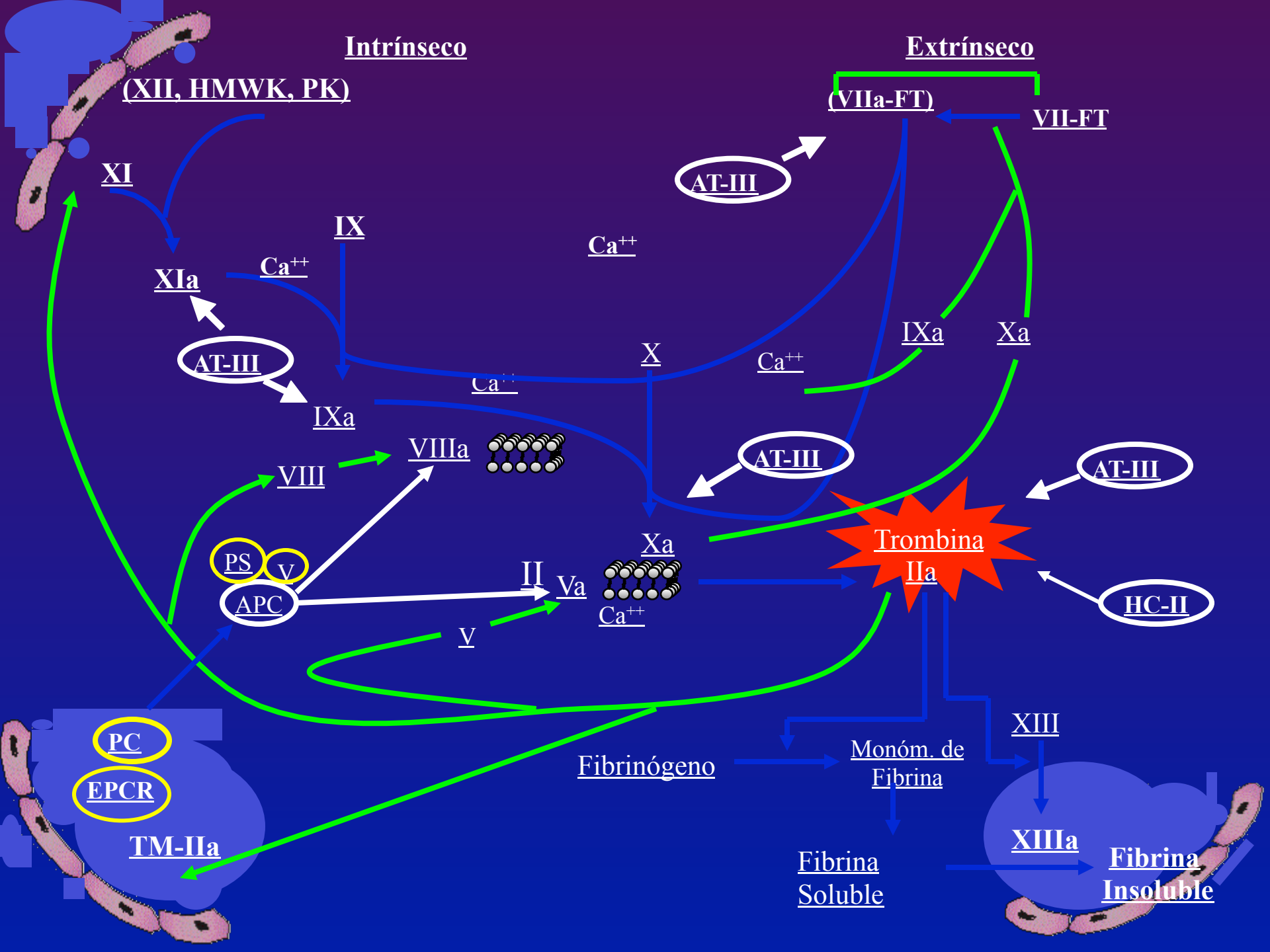
Asociación con trombosis arterial incierta

Su nivel puede aumentar en tratamientos hormonales y en el embarazo

Valor disminuído en recién nacidos y niños hasta los 16 años

Proteína C

- **NO SOLICITAR EN EPISODIO AGUDO**
- **SUSPENDER WARFARINA POR LO MENOS 10 DIAS ANTES DE CUANTIFICAR**



Proteína C

Deficiencia Adquirida

- **Procesos de consumo intravascular:**
 - CID, preeclampsia, estado post operatorio.
- **Síntesis disminuida:**
 - Enfermedad hepatocelular, deficiencia de vitamina K, quimioterapia.
- **Inhibidor:**
 - Uremia.

PROTEINA C-SIEMENS



 Absorbancia a 405 nm es inversamente proporcional a la actividad de PC

$$\text{Proteína C}_{\text{Muestra}} (\% \text{ del V.N}) = F_L \times \Delta E / \text{min}_{\text{muestra}}$$

$$F_L = \frac{\text{Valor Teórico} (\% \text{ del valor normal})_{\text{plasma de referencia}}}{\Delta E / \text{min}_{\text{plasma de referencia}}}$$

* piro-acido glutámico-prolin-arginin-metoxi-nitroanilin

70-140% del VN



Proteína S

- 1977 Investigadores en Seattle descubrieron una proteína vitamino K-dependiente
“S” por Seattle
- 1980 Proteína S incrementa la inactivación del factor Va producida por la proteína C
- 1984 Primer paciente deficiente en Proteína S

Proteína S

- Cofactor para la función anticoagulante de la proteína C activada al aumentar la afinidad de la proteína por los fosfolípidos con carga eléctrica negativa
- Inhibe directamente: Va, VIIIa, y Xa.
- Solo la Proteína S libre tiene actividad cofactor.
- Proteína S libre: 40% del total.
- ~ 60% de la PS circulante está unida al C4b-BP.

DEFICIENCIA DE PROTEÍNA S (PS)

Comp et al. (1984).

Casi 200 mutaciones diferentes del PROS1

Herencia autosómica dominante.

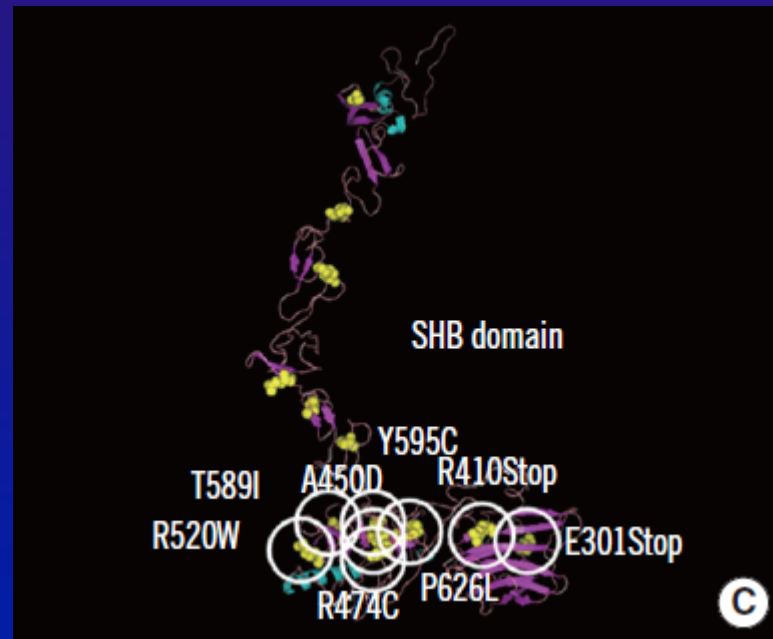
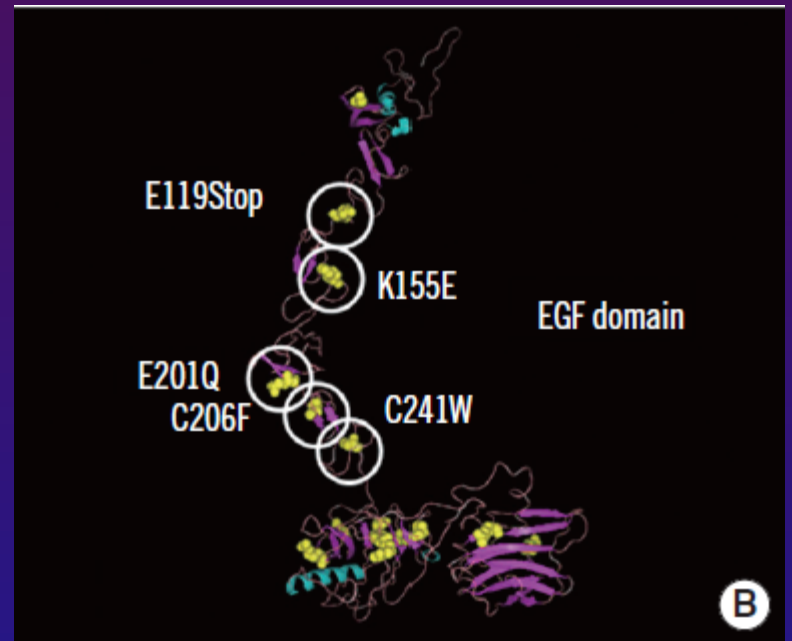
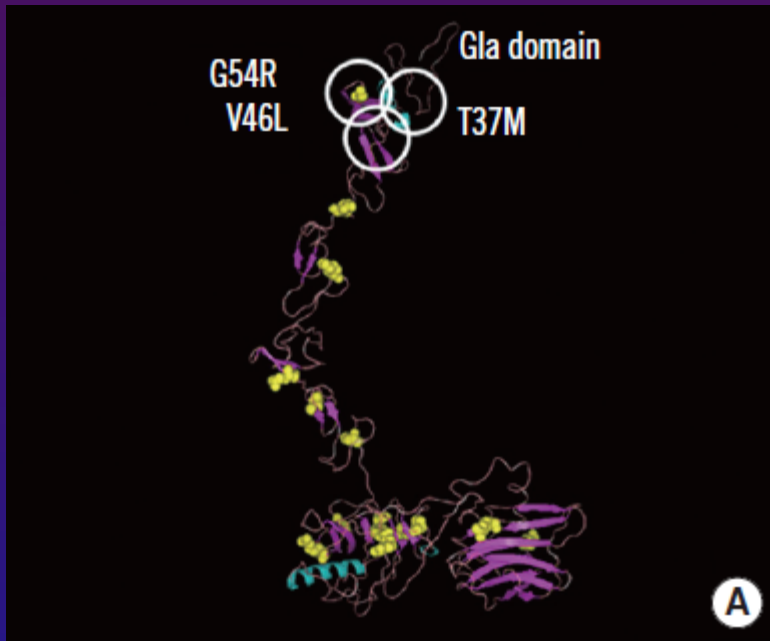
Prevalencia:

en población normal	<1%
en familias trombofílicas	6 %
en pacientes con trombosis venosa	1-3%

Heterocigota riesgo x 2, trombosis antes de 40 años.

Asociación con trombosis arterial incierta

Valores disminuídos en el niño, embarazo y puerperio

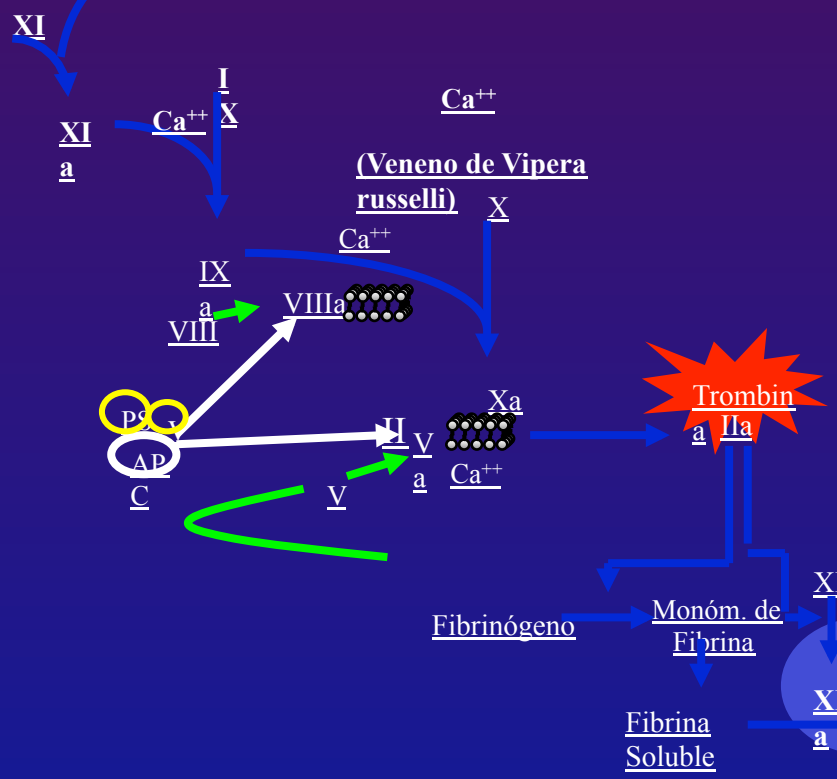


Proteína S

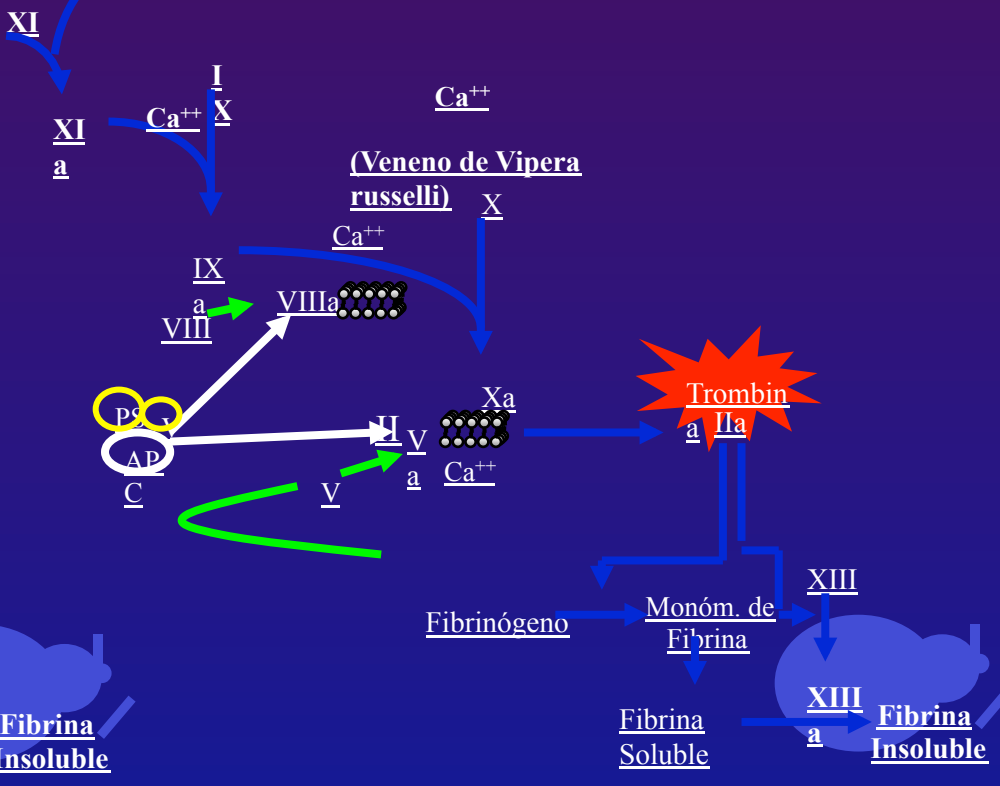
Deficiencia Adquirida

- Incremento en C4b-BP
 - Embarazo, anticonceptivos orales, inflamación, SIDA.
- Síntesis disminuida de PS
 - Infantes, enfermedad hepática, deficiencia de vitamina k, terapia con Coumadin.
- Otros:
 - Enfermedad de células falciformes, policitemia vera, varicela, anticoagulante lúpico.

(Veneno de Vipera russelli)



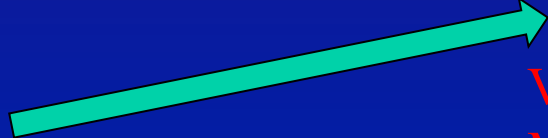
(Veneno de Vipera russelli)



Plasma del paciente



Plasma del paciente + Plasma deficiente en Proteina S (Libre de C4bBP)



Tpo. de Formación de Coagulo

Varones: 75% -> 130% (104%)

Mujeres sin CO: 59% - 118% (90%)

Mujeres con CO: 52% - 118% (81%)

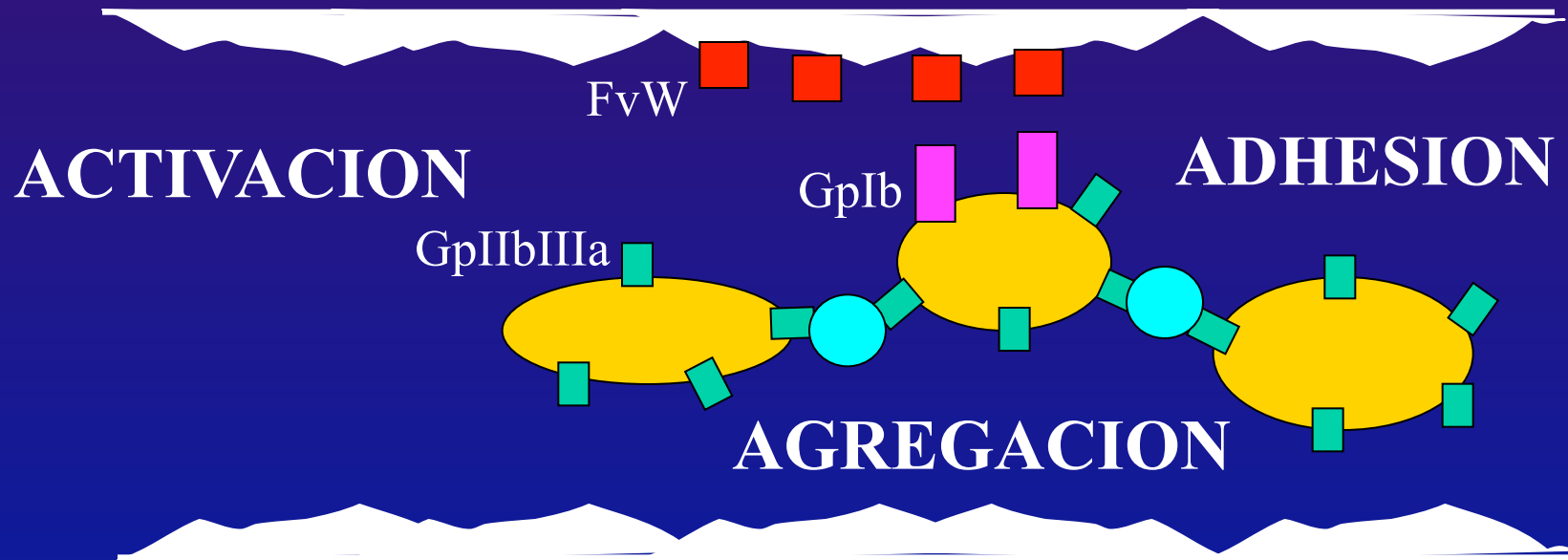
Russell's viper (*Vipera russelli*)



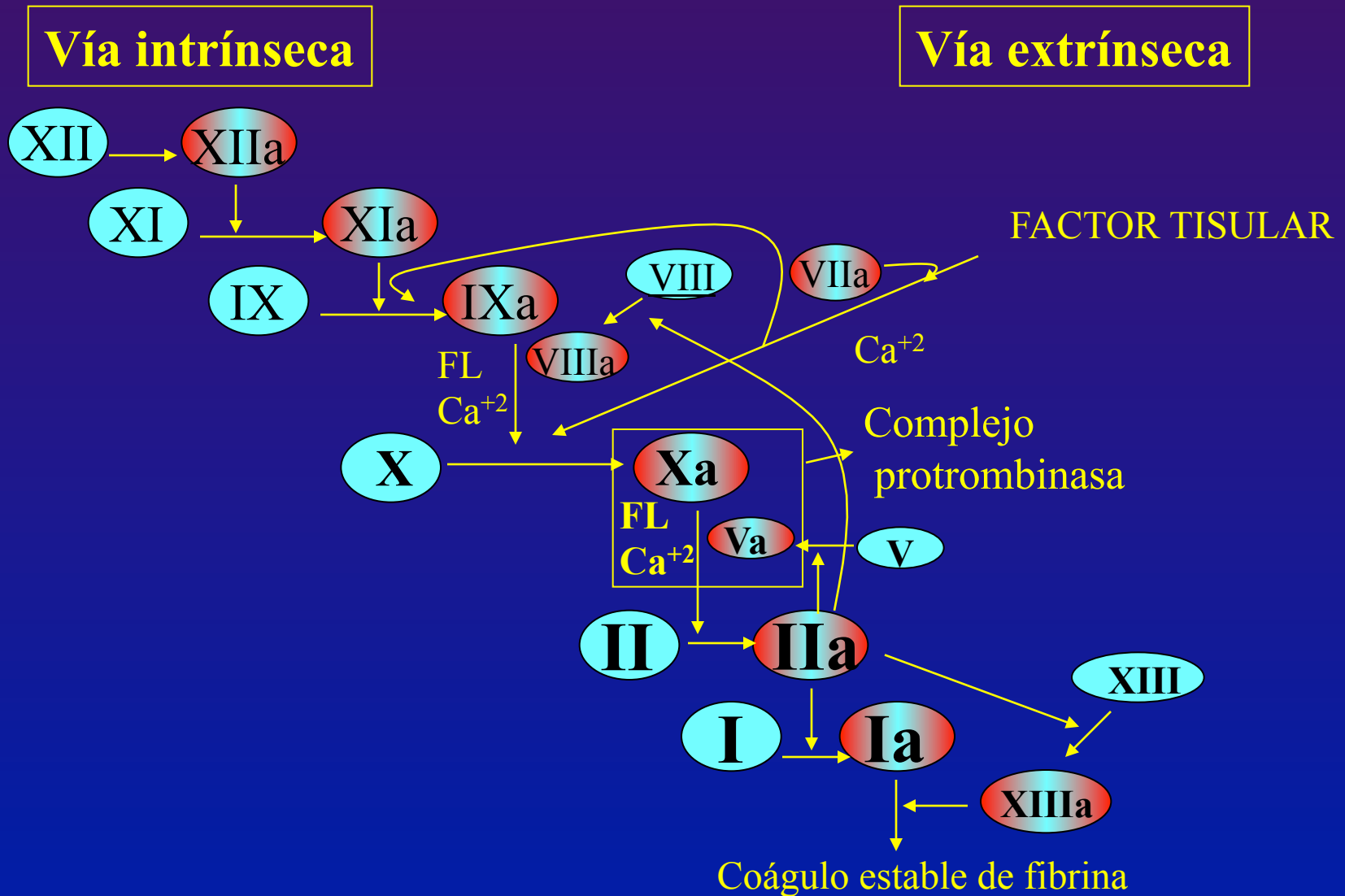
A.S Pradeep Gangadkar.

Hemostasia primaria

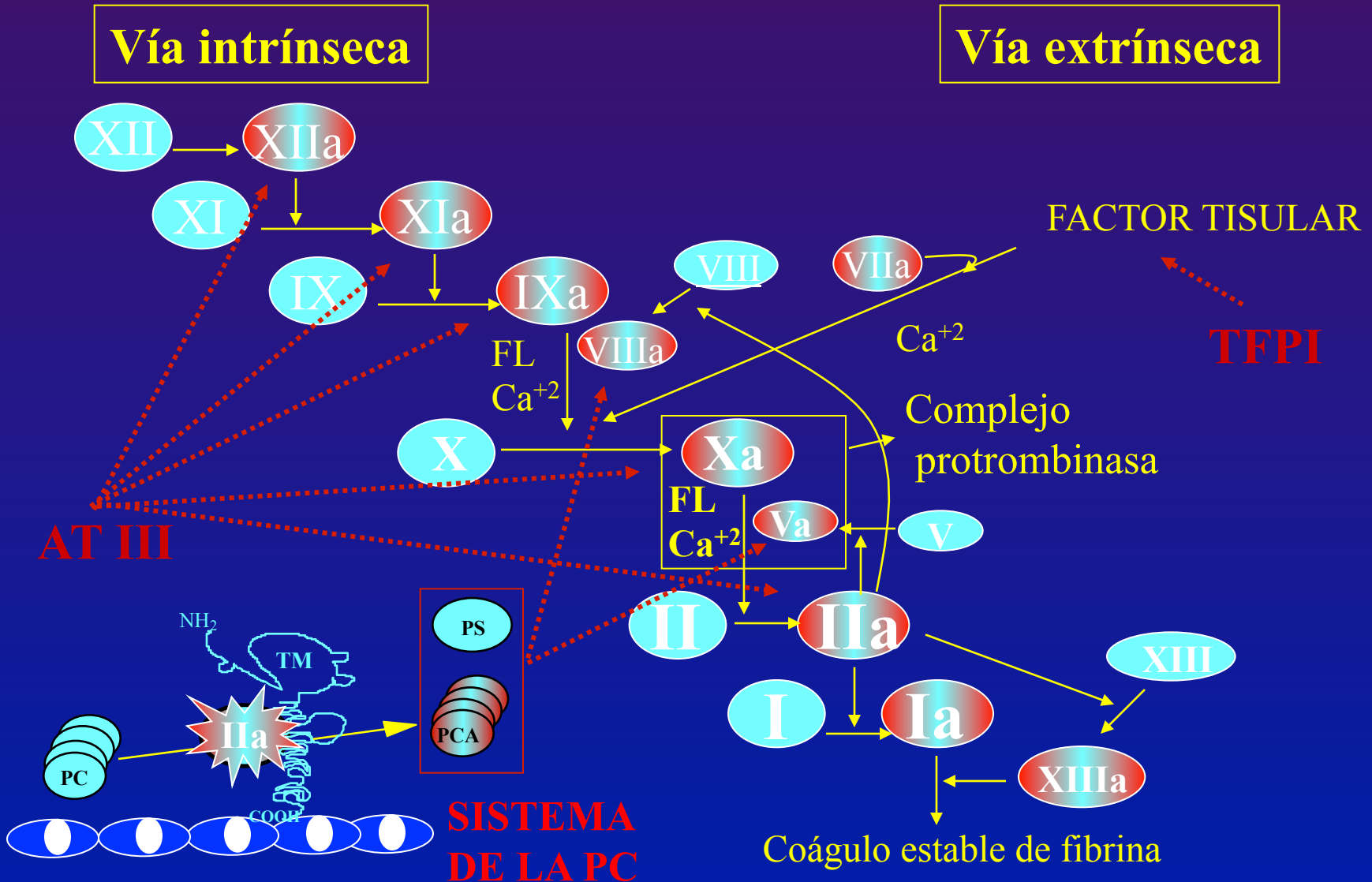
Tapón plaquetar:



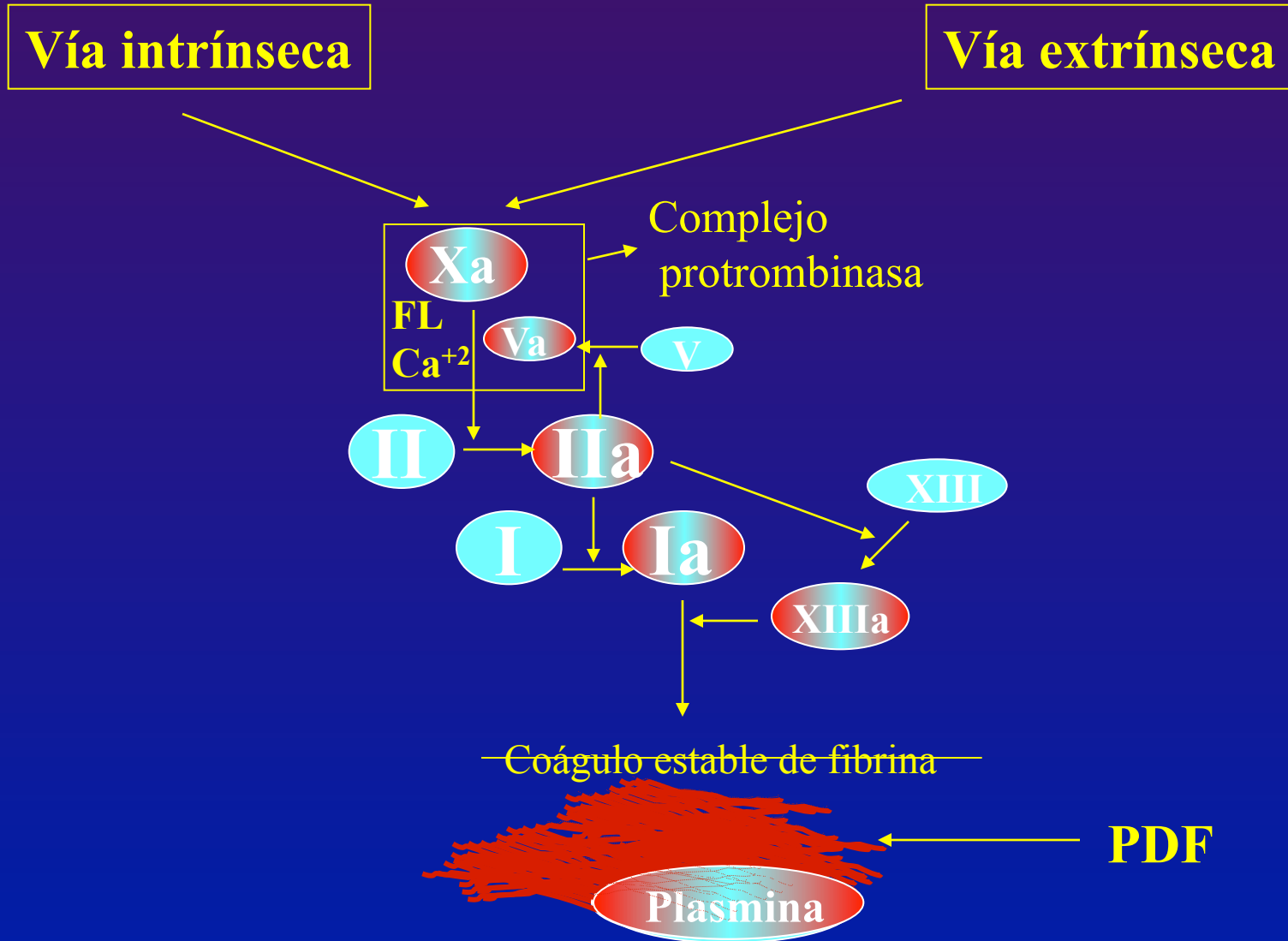
Cascada de la coagulación



Inhibición de la coagulación



Fibrinolisis



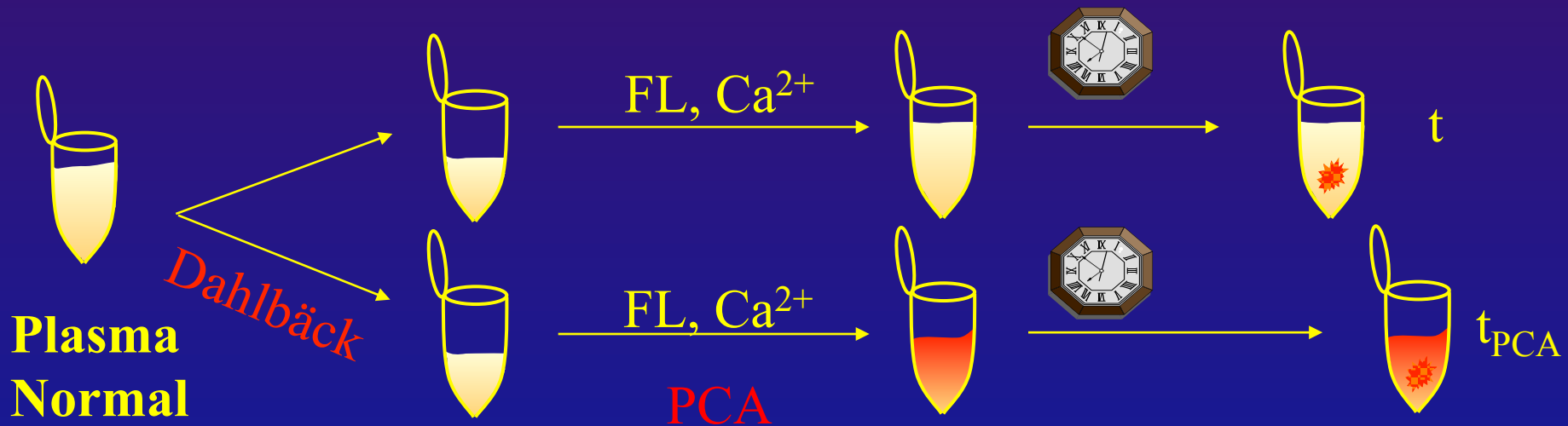
Pruebas de laboratorio

Coagulación :

- ✿ Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA)
- ✿ Tiempo de protrombina
- ✿ Tiempo de trombina
- ✿ Tiempo de reptilase
- ✿ Dosificación de factores

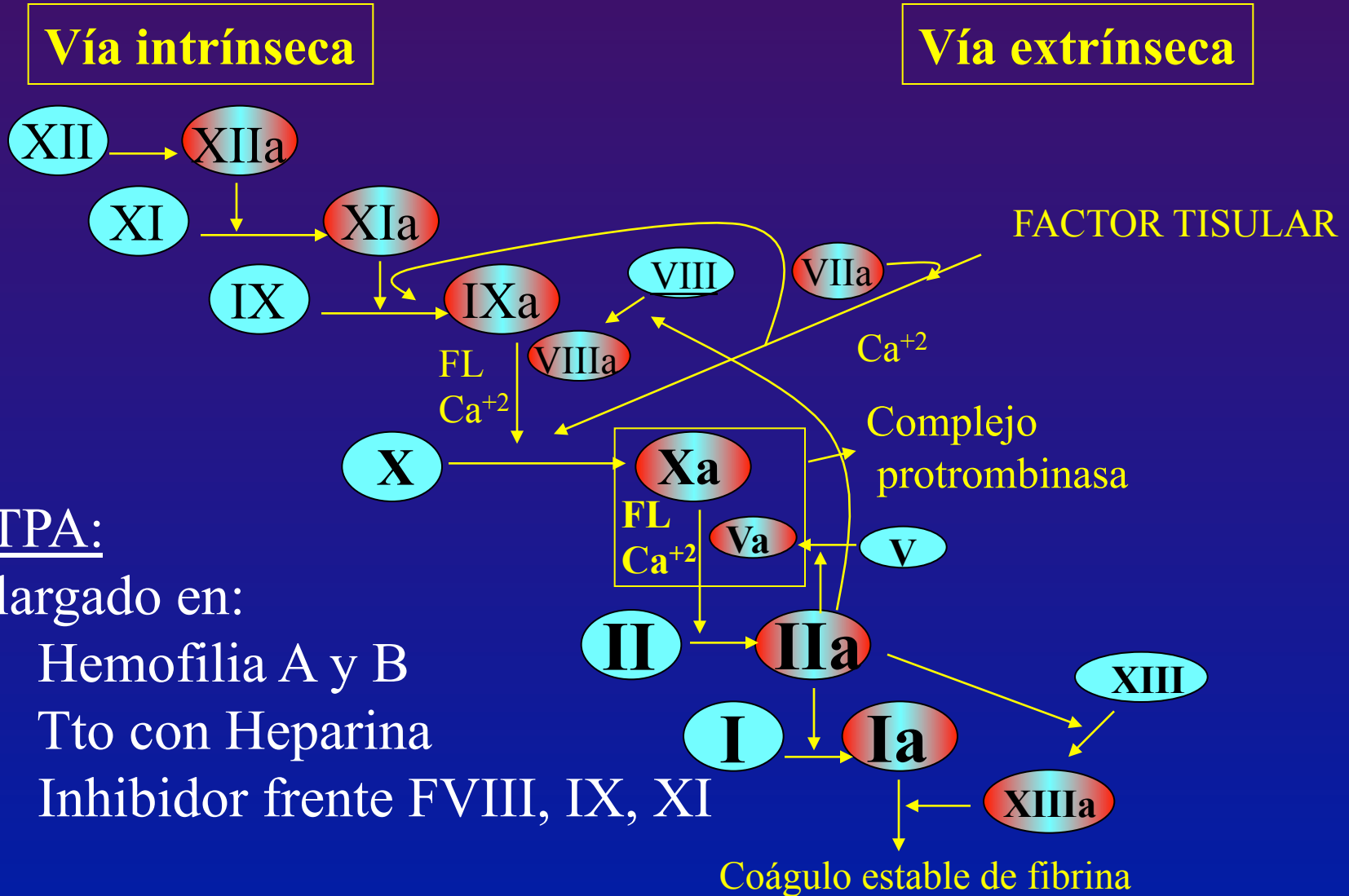
Pruebas de laboratorio

Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) :



$$\text{Cociente} = \frac{t_{PCA}}{t} \Rightarrow \text{Respuesta anticoagulante}$$

Cascada de la coagulación



TTPA:

Alargado en:

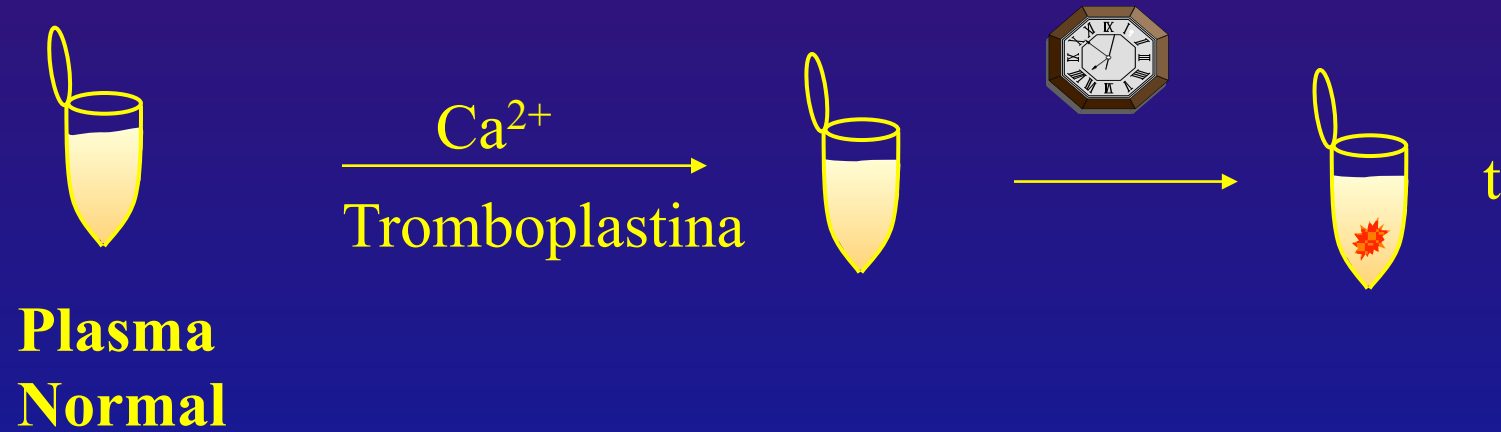
Hemofilia A y B

Tto con Heparina

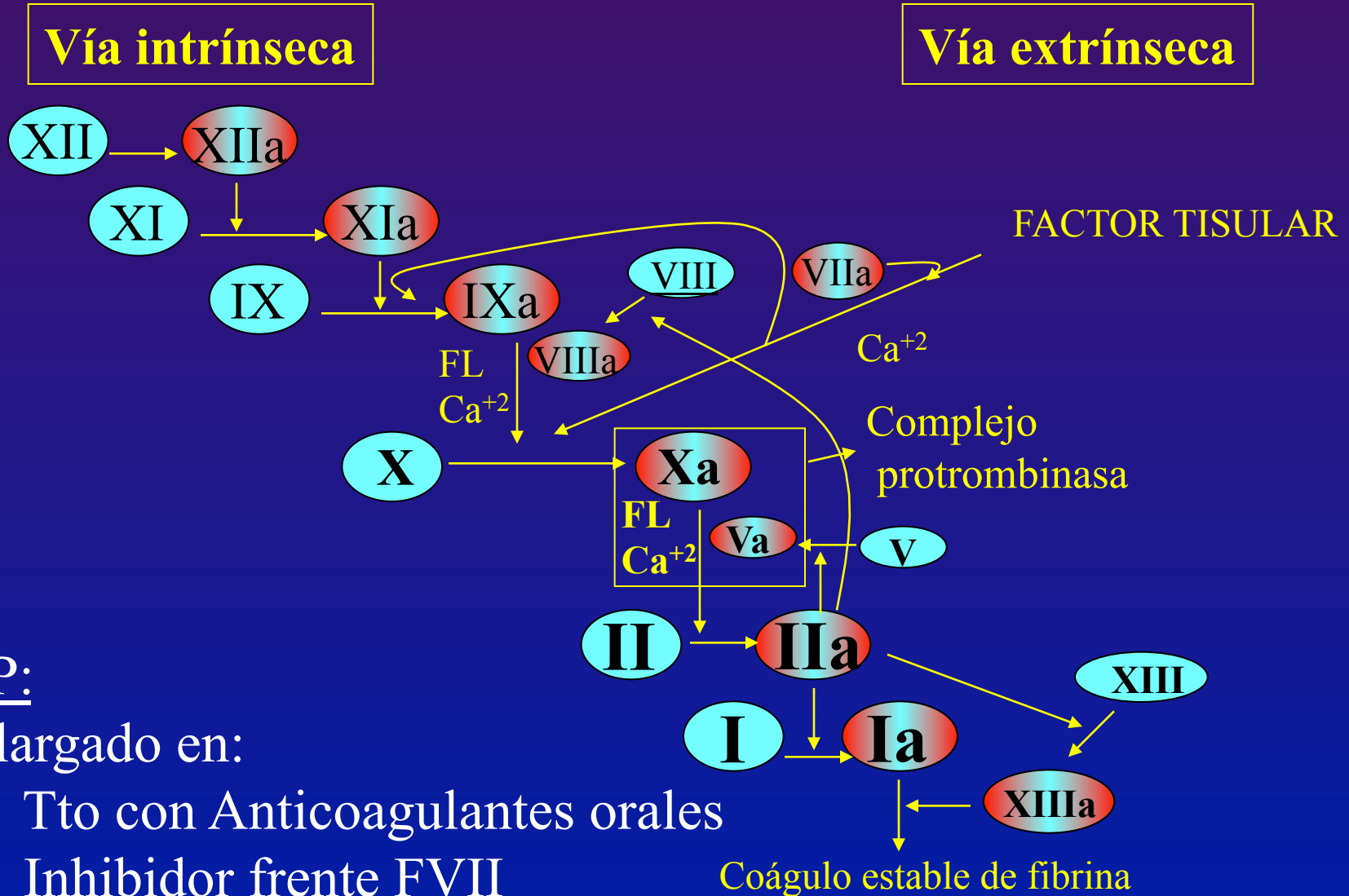
Inhibidor frente FVIII, IX, XI

Pruebas de laboratorio

Tiempo de protrombina (TP) :



Cascada de la coagulación



TP:

Alargado en:

Tto con Anticoagulantes orales

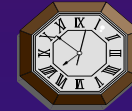
Inhibidor frente FVII

Pruebas de laboratorio

Tiempo de trombina (TT) :



Trombina



t

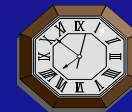
**Plasma
Normal**

Mide la actividad del fibrinógeno

Tiempo de ecarina:



Veneno

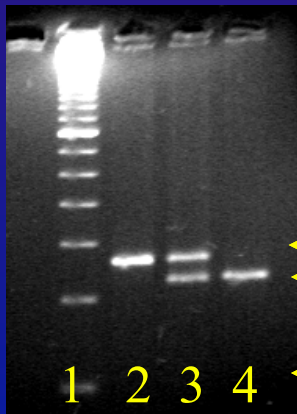
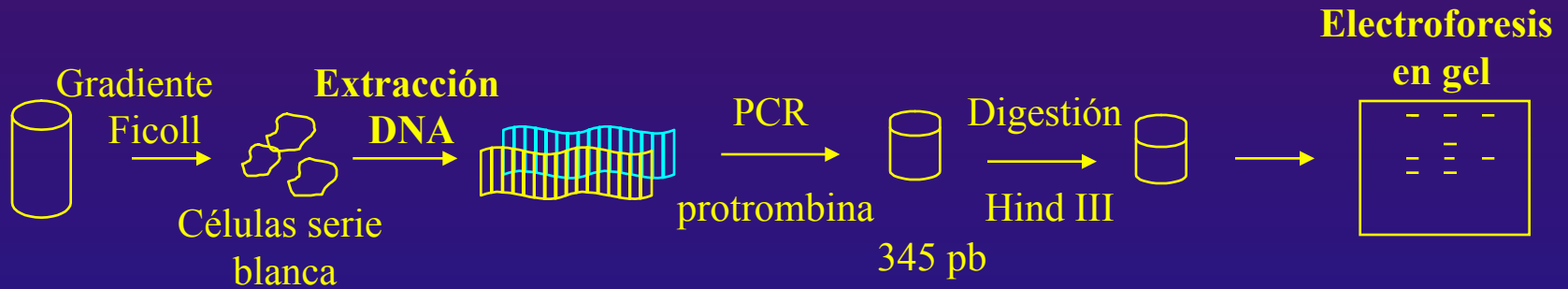


t

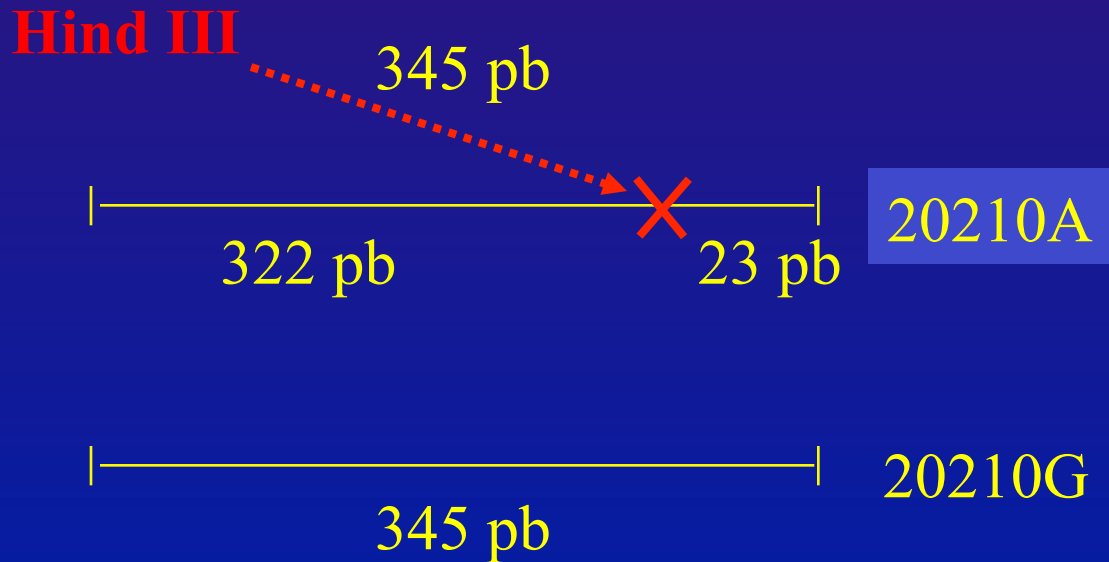
**Plasma
Normal**

Valora los inhibidores directos de la trombina

Detección de G20210A



1: Marcador pares de bases
2: GG 3: GA 4: AA



Plasminógeno

Plasmina

tPA

(XII, HMWK, PK)

(VIIa-FT)

VII-FT

XI

IX

XIa

Ca⁺⁺

Ca⁺⁺

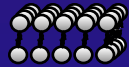
Ca⁺⁺

X

Ca⁺⁺

IXa

VIIIa



Xa

II
Va

Ca⁺⁺



Trombina

IIa

Fibrinógeno

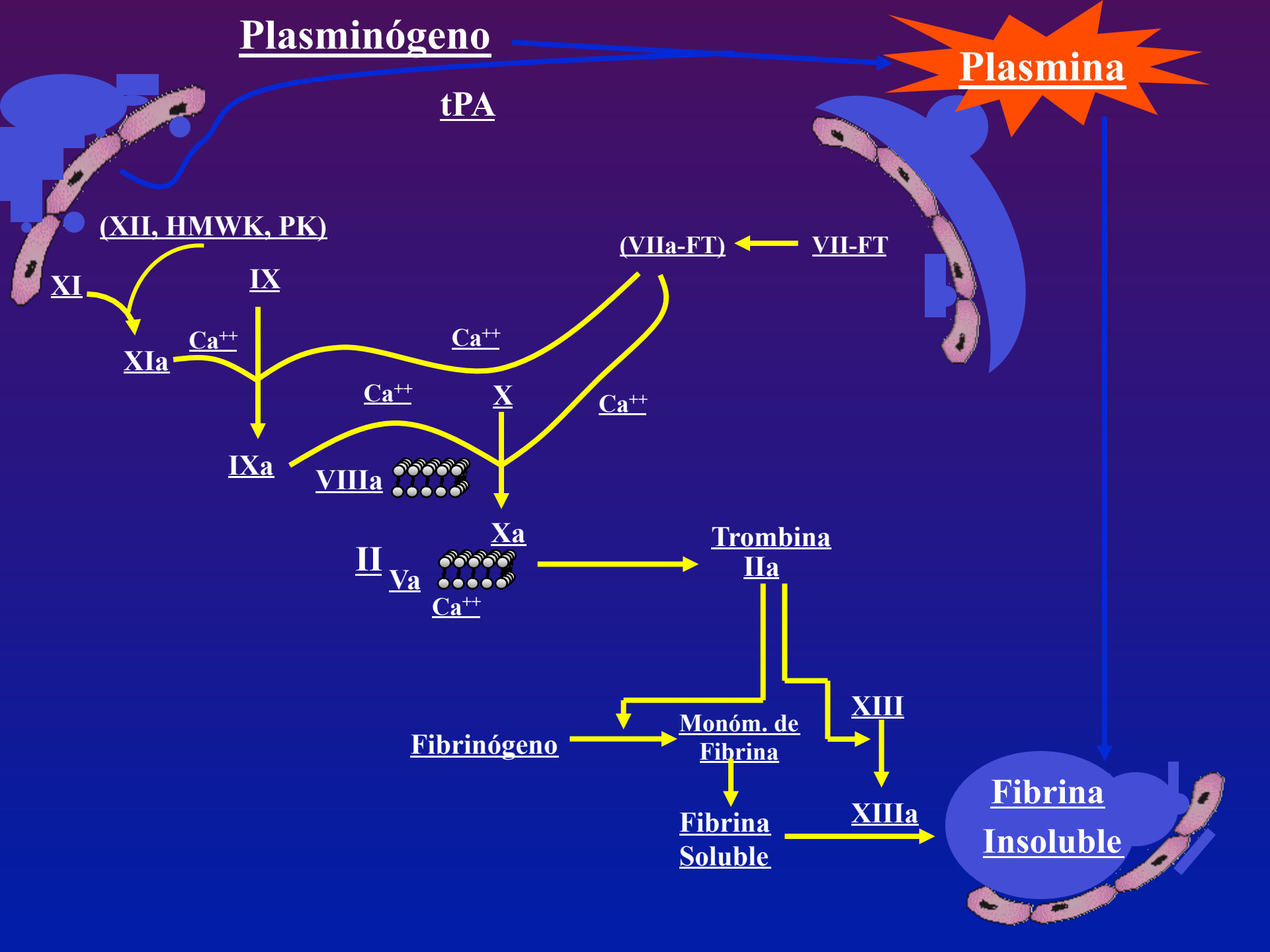
Monóm. de
Fibrina

Fibrina
Soluble

XIII

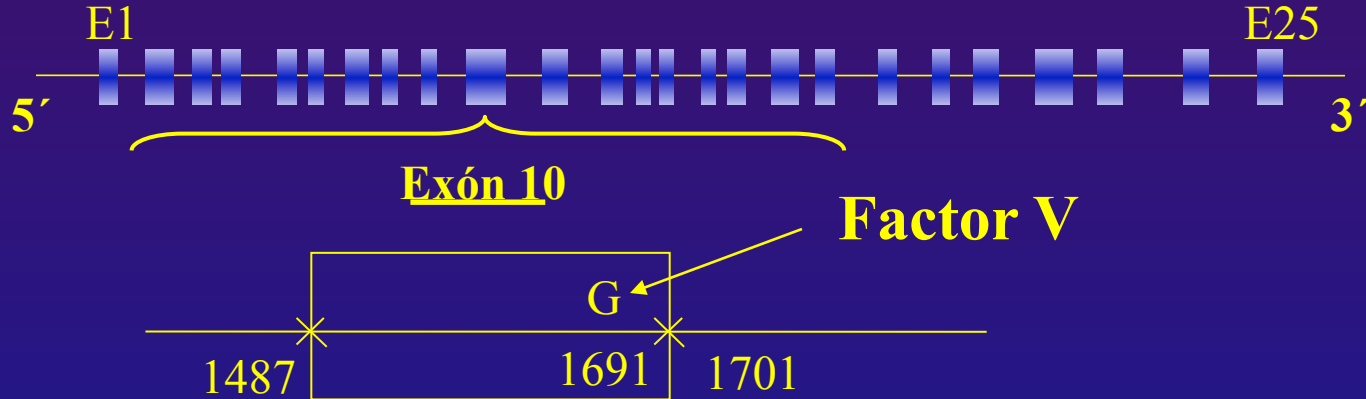
XIIIa

Fibrina
Insoluble

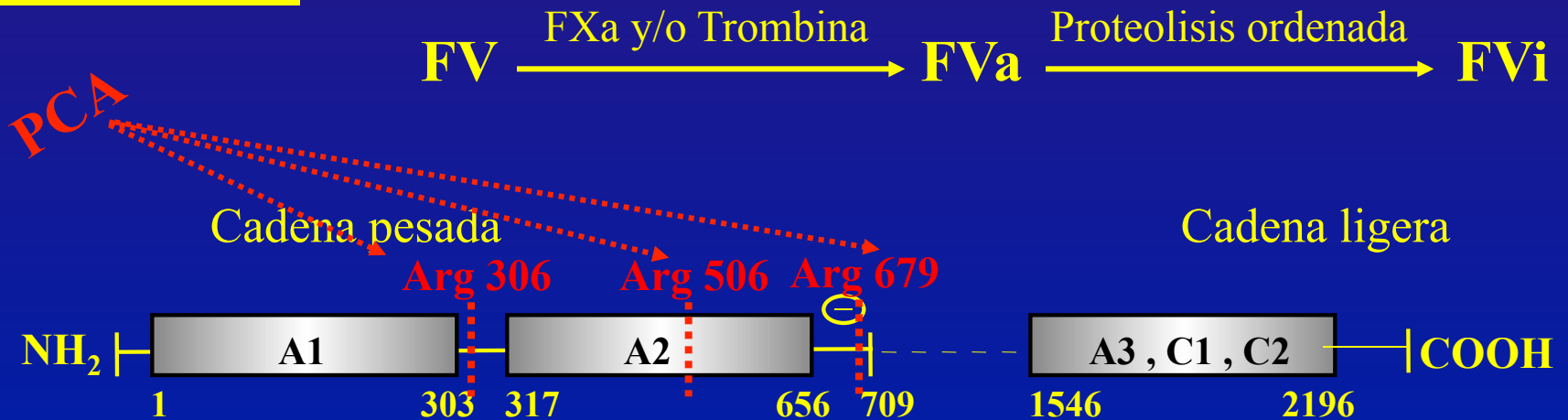


Factor V

• Gen FV



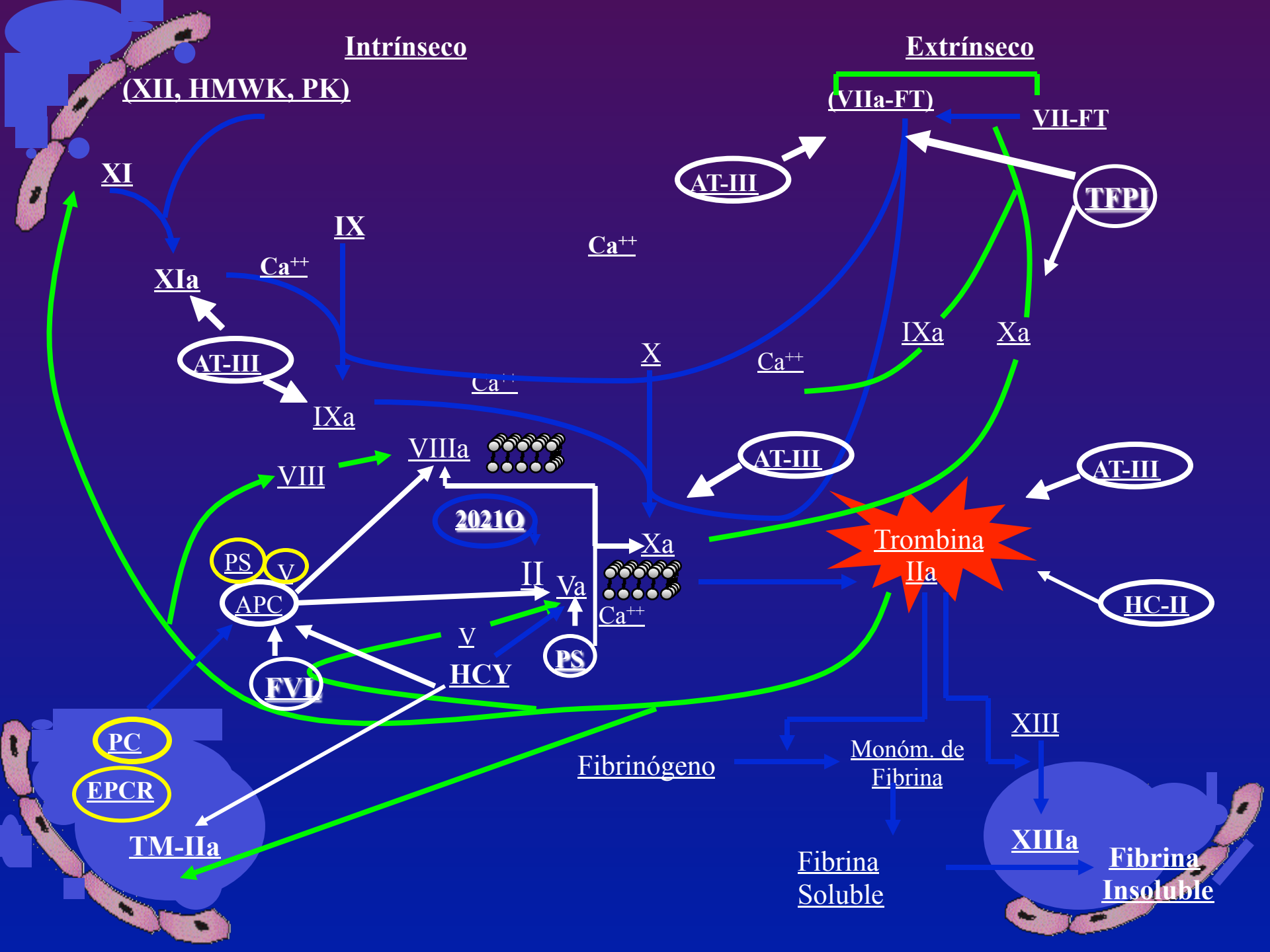
• Proteína FV



PROTROMBINA (G20210A)

Se debe de solicitar éste estudio:

- pacientes con trombosis recurrentes**
- primer episodio antes de los 50 años**
- sitios inusuales de trombosis (cerebrales, hepáticas,etc)**
- pérdida inexplicable de embarazo en 2do. o 3er. trimestre**
- familiares de probando**
- no está indicado como test de screening en ninguna situación**



Intrínseco

Extrínseco

(XII, HMWK, PK)

(VIIa-FT)

VII-FT

AT-III

TFPI

XI

XIa

Ca⁺⁺

IX

Ca⁺⁺

AT-III

IXa

X

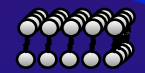
Ca⁺⁺

IXa

Xa

AT-III

VIIIa



VIII

20210

Xa

Va

Ca⁺⁺

PS

V

II

Va

V

HCY

PS

APC

FVI

Trombina IIa

AT-III

HC-II

PC

EPCR

TM-IIa

Fibrinógeno

Monóm. de Fibrina

Fibrina Soluble

XIII

XIIIa

Fibrina Insoluble

