

Resistencia a la proteína C activada

Mónica Duarte

La resistencia a la proteína C activada (RPCa) fue descrita recientemente como la causa más importante de enfermedad tromboembólica de origen congénito. Esta patología es desconocida en nuestro medio y esta revisión pretende dar a conocer el cuadro clínico y biológico descritos, así como su evolución, profilaxis y manejo, dada su gran incidencia. La revisión se realiza con base en las publicaciones del autor que la describió: Dalhbäck, su grupo de trabajo, las revisiones actualizadas del último Congreso Internacional de Trombosis y Hemostasia (Florencia 97) y la revisión bibliográfica computarizada sobre el tema específico de RPCa. La cual se debe en la mayoría de los casos a una mutación puntual del gen del factor V:

sustitución de una arginina (R) por una glutamina (Q) en la posición 506 del gen del factor V: FVa: Q⁵⁰⁶, que se traduce en una resistencia al clivaje por la proteína C activada y como consecuencia persiste un factor Va íntegro con propiedades procoagulantes. Existe riesgo aumentado de episodios trombóticos en pacientes con este trastorno genético, especialmente en aquellos con mutación homocigota. Es necesario estudiar la RPCa en todo paciente que presente un episodio trombótico sin factores de riesgo conocidos o en aquellos con trombosis recurrentes. El manejo de estos pacientes es básicamente preventivo en circunstancias que conllevan riesgo de trombosis: cirugía, inmovilización prolongada, embarazo. Además los anticonceptivos orales están contraindicados. Los pacientes que presentan RPCa asociada a otra alteración congénita como deficiencia de las proteínas C o S presentan un mayor riesgo de enfermedad tromboembólica a edad más temprana.

Introducción

Los estados de hipercoagulabilidad son causados por trastornos de tipo congénito o adquirido. El defecto congénito se conoce como trombofilia, y consiste en la tendencia familiar a presentar enfermedad tromboembólica. La primera causa de trombofilia fue descrita en 1965 por Egeberg (1): deficiencia de antitrombina III. Posteriormente se informaron las deficiencias de proteína C (2) y proteína S (3) de la coagulación. La resistencia a la proteína C activada (RPCa) fue descrita en 1993 por Dahlbäck (4) y fue reconocida como la causa más frecuente de trombofilia (5). Se demostró que la adición de proteína C activada (PCa) al plasma humano normal, prolonga el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT). La PCa es una proteasa de serina con potentes propiedades anticoagulantes; inhibe la formación de trombina mediante la degradación de factores activados como el Villa y el Va por un clivaje proteolítico selectivo (6-8). En 1994 se detectó una anomalía del factor V asociada a la RPCa (9), el cual posteriormente se identificó como una mutación específica del gen del factor V de la coagulación, que se traduce en la sustitución de arginina (R) en la posición 506 por glutamina (Q) (FV: Q⁵⁰⁶), también conocida como factor V de Leiden (10-

Dra. Mónica Duarte: Hematóloga, Fundación Santa Fe de Bogotá.

14). En condiciones fisiológicas, el factor V pasa a su estado activo, factor Va, por la α -trombina, después de los clivajes en las posiciones Arg⁷⁰⁹, Arg¹⁰¹⁸ y Arg¹⁵⁴⁵. El factor Va es inactivado por la PCa mediante el clivaje en la Arg⁵⁰⁶, que lleva a exposición adecuada de los clivajes inactivados Arg³⁰⁶ y Arg⁶⁷⁹. La mutación hace que el factor Va sea parcialmente resistente a la degradación por la proteína C activada, lo cual conduce a un estado de hipercoagulabilidad por persistencia de la actividad del factor Va, específicamente por la rápida generación y acumulo de su cadena pesada como consecuencia del clivaje retardado de la Arg⁵⁰⁶ (15-18). El riesgo de trombosis venosa se incrementa de cinco a diez veces en portadores heterocigotos y de 50 a 100 veces en homocigotos (19).

Esta patología es desconocida en nuestro medio y su gran importancia epidemiológica, hace necesaria y urgente su difusión. Su estudio constituye la base del tamizaje del paciente con enfermedad tromboembólica.

Material y método

La revisión se realiza con base en las publicaciones del autor que la describió: Dalhbäch, su grupo de trabajo, las revisiones actualizadas del último Congreso Internacional de Trombosis y Hemostasia (Florencia 97) y la revisión bibliográfica computarizada sobre el tema específico de RPCa.

Los artículos fueron seleccionados dependiendo de su relevancia en las áreas de fisiopatología y terapéutica, tomando como base los artículos de los grupos con mayor experiencia.

Epidemiología

Las deficiencias congénitas de antitrombina III, proteína C y proteína S constituyen menos de 15% de los casos de trombosis en pacientes occidentales, mientras que la prevalencia del alelo FV:Q⁵⁰⁶ en pacientes con trombosis venosas es elevada y ha sido informado desde 13% (20), 21% (21), 40% (22) y 54 a 65% (23), hasta 94% de los casos (24). En individuos sanos esta alteración genética es común en poblaciones de origen caucásico, especialmente en el norte de América del Norte (25) y de Europa (26-28); donde se observa prevalencia entre uno y 15%, la cual es extremadamente elevada en Suecia: 11 a 15% (24). En otros grupos étnicos la RPCa es de muy baja incidencia, como en japoneses en quienes no se ha detectado la mutación y en chinos (26, 29). De hecho, la enfermedad tromboembólica es mucho menos frecuente en Asia. No se ha determinado el origen genético o adquirido de los pocos casos descritos de RPCa en estas áreas. El confinamiento de la mutación del factor V a ciertas áreas geográficas hace pensar más en mutación de tipo heredado, que en mutación de tipo espontáneo (26).

La gran incidencia de RPCa nos lleva a considerar este diagnóstico como el más importante en el paciente con enfermedad tromboembólica venosa recurrente o no asociada a factores de riesgo, incluyendo los mayores de 60 años. También ha sido detectada en jóvenes con trombosis arterial, aunque no se ha demostrado asociación directa de ésta con la RPCa.

Diagnóstico

La RPCa fue descubierta en un paciente trombofilico de mediana edad, cuando se observó que la adición de PCa no produjo la respuesta anticoagulante esperada en una prueba del tiempo parcial de tromboplastina activada. Esto constituyó la base para la prueba de la RPCa. En ésta se efectúan dos reacciones de APTT, una de las cuales contiene una concentración conocida de PCa y el resultado se expresa como la razón entre las dos pruebas (4, 30). Así se determinó que la RPCa es frecuente en pacientes con episodios tromboembólicos (5, 31). La RPCa se corrigió adicionando factor V intacto, lo que llevó a la asociación con el gen del factor V (9). Posteriormente se desarrolló una prueba con el mismo principio, pero una de las reacciones de APTT con déficit conocido en factor V. Se demostró que los resultados de ésta son de alto valor predictivo para la mutación V, confirmada por técnicas de biología molecular (32).

La mutación puntual del gen del factor V se asocia con el fenotipo de la RPCa y consiste en la sustitución de adenina por guanina en la posición del nucleótido 1691 (1691 G—A). Esta mutación lleva al reemplazo de arginina (R) en la posición 506 de la molécula de factor V por glutamina (Q). En la nomenclatura internacional se conoce como FV:Q⁵⁰⁶, FV:R⁵⁰⁶Q o factor V de Leiden (10, 12,13,33). La transmisión es autosómica dominante (22). Otras alteraciones genéticas podrían llevar a este fenotipo de RPCa (34).

Los estudios comparativos entre las pruebas funcionales y las genéticas son necesarios para es-

tablecer los rangos normales y el valor de RPCa asociado con la mutación del factor V, para cada laboratorio. Las pruebas de biología molecular mediante las técnicas de PCR-RFLP ("*Polymerase chain reaction*"-"*Restriction fragment length polymorphism*") son de alta sensibilidad y especificidad pero de alto costo (35). Por otra parte, aún no se ha definido la importancia pronóstica de detectar pacientes con mutación de tipo heterocigota (36). No todos los estudios muestran correlación diagnóstica entre la prueba funcional y los pacientes heterocigotos, lo que hace necesaria la confirmación por biología molecular (37).

La proteína S participa como cofactor en el proceso de degradación de los factores de coagulación Va y VIIIa, pero especialmente en otros puntos de clivaje diferentes al de la PCa, como el nucleótido 306. Esto podría explicar el bajo grado de manifestaciones clínicas, si se compara con las deficiencias de ATIII, PC o PS, ya que en los casos de RPCa por el factor V de Leiden, existe actividad proteolítica por parte de la proteína S, que llevaría a degradación parcial del factor Va, impidiendo su persistente actividad procoagulante y reduciendo la posibilidad de compromiso clínico. Sin embargo, ya se ha descrito la púrpura neonatal fulminante secundaria a la RPCa (38). La prueba funcional para la RPCa se altera en los casos de anticoagulación oral o en presencia de antifosfolípidos (35, 36). Trossaert y cols (39) utilizan la prueba modificada de Jorquera en pacientes con anticoagulación oral, y confirman su validez. Otras alternati-

vas para los pacientes con anticoagulantes orales que requieran estudio para detectar la RPCa, son los estudios de biología molecular (37), sabiendo que hay pacientes con RPCa que no presentan la mutación descrita y que pueden llegar hasta 20%. Si estos pacientes requieren una evaluación biológica completa (RPCa, deficiencias de proteína C o S y de antitrombina III), se preferirá cambiar el esquema de anticoagulación por heparinas de bajo peso molecular, tomar las muestras dos a tres semanas después de la última dosis de anticoagulante oral, y regresar posteriormente al esquema de anticoagulación inicial.

Los marcadores de activación de la coagulación estudiados en pacientes homocigotos, como los fragmentos 1+2, Dimero-D y TAT, no se han encontrado sistemáticamente positivos y no constituyen un medio de control biológico (20, 40).

El estudio debe extenderse a los familiares más cercanos del paciente, con el fin de detectar precozmente el riesgo de trombosis y prevenirla, especialmente en situaciones de alto riesgo.

Clínica

Los pacientes con RPCa presentan manifestaciones clínicas similares a las otras causas de trombofilia congénita: deficiencia de antitrombina III, proteína C o proteína S. Son más frecuentes las trombosis venosas profundas, pero también se ha detectado en pacientes con trombosis arterial, sin que se haya demostrado una correlación con el infarto de miocardio o el ACV (41, 42).

En algunos estudios se ha observado asociación de la RPCa con

aumento del riesgo de trombosis arterial cerebral o miocárdica (43-46), pero otros informes no han corroborado esta asociación (25). Por el momento, no se puede afirmar que exista correlación, hasta cuando se disponga de estudios válidos. El tromboembolismo pulmonar es menos frecuente en los pacientes con RPCa que en aquellos con otras deficiencias congénitas (47-48).

El riesgo y la severidad de la enfermedad tromboembólica depende del genotipo del factor V (49). En una población de 33 años de edad pueden observarse episodios trombóticos en 8% en sujetos normales, 20% en heterocigotos para la mutación del factor V de Leiden y 40% en homocigotos (24).

En todo paciente que requiera estudio para trombofilia congénita se realizarán también las pruebas para AT III, proteína C y proteína S, ya que la combinación de la RPCa y alguna de estas deficiencias, comporta un riesgo mayor de trombosis (20, 50,51).

Además de los riesgos genéticos, se deben tener en cuenta factores circunstanciales precipitantes, que se han informado hasta en 63% de pacientes con RPCa. Estos incluyen: cirugía, embarazo, trauma y anticoncepción oral (24).

En pacientes que presentan RPCa y reciben anticonceptivos orales, el riesgo de trombosis en heterocigotas aumenta de 35 a 50 veces y en homocigotas varios cientos de veces (14, 19, 52, 53). Este hallazgo podría llevar a la detección sistemática de la RPCa, antes de iniciar anticonceptivos orales, lo cual debe realizarse en toda pacien-

te con antecedente personal o familiar de trombosis. Se pensó que las complicaciones tromboembólicas pudieran estar relacionadas directamente con la generación de anticonceptivos y su contenido hormonal, pero al parecer la tercera generación se asocia con un porcentaje de trombosis comparable a la primera (54, 55).

En pacientes con RPCa, se han descrito abortos espontáneos repetidos y trombosis placentaria, no correlacionados con el tipo de defecto genético, homocigoto o heterocigoto (56). Por otra parte, se ha detectado RPCa en 60% de las embarazadas con complicaciones trombóticas y en 30% de las pacientes que reciben anticonceptivos orales (57). Existe aumento del riesgo de tromboembolismo pulmonar y trombosis venosa profunda durante el embarazo, particularmente en el primer trimestre y el postparto (20, 58).

La expectativa de vida no se afecta por la RPCa. como se demostró en un estudio sobre las causas de mortalidad de padres de pacientes homocigotos, comparado con la población general. Los eventos tromboembólicos no constituyeron la principal causa de muerte directa o indirecta (59). En pacientes de cien años de edad, se han descrito las mismas frecuencias de la mutación de Leiden que en la población general, lo que confirma que la RPCa no es un factor que determine la longevidad (60). Estos planteamientos no justifican la anticoagulación permanente, especialmente si tenemos en cuenta que por el tratamiento anticoagulante se presentan hemorragias mayores en 2 a 3% de los pacientes por año (61,

62). Sin embargo, se requieren estudios con más pacientes y mayor seguimiento, para definir el real impacto de la mutación homocigota, en particular en la sobrevida y complicaciones.

En algunos pacientes con hemofilia A severa se ha detectado RPCa concomitante, encontrando una presentación clínica menos severa de los episodios hemorrágicos (63).

Terapéutica

El tratamiento de los pacientes con RPCa con o sin mutación del factor V, es básicamente preventivo, como en cualquiera de las deficiencias de AT III, PC y PS: anticoagulación en situaciones de riesgo, y contraindicación para el uso de anticonceptivos orales. En estudios retrospectivos se ha demostrado que el manejo con anticoagulantes orales es eficaz. Sin embargo, la baja frecuencia de episodios recidivantes en heterocigotos, no justificaría el manejo anticoagulante profiláctico.

Se recomienda tratamiento profiláctico con heparina o anticoagulantes orales en situaciones de riesgo "trombogénico" para homocigotos y heterocigotos que presenten una deficiencia asociada de alguna proteína anticoagulante (cirugía, embarazo), aunque no haya historia personal o familiar de trombosis. Para los homocigotos sólo se recomienda en situaciones de alto riesgo, pero aún no se ha establecido si es necesario en cualquier situación de riesgo (15,64). El tratamiento anticoagulante permanente debe ser considerado solamente en pacientes con episodios de trombosis recurrente, y en homocigotos para el alelo FV:Q⁵⁰⁶ después de un episodio

tromboembólico o con algún otro riesgo genético asociado (14). En pacientes asintomáticos no se administrará profilaxis, si no se ha demostrado trombofilia familiar y en los heterocigotos sin episodios familiares de trombosis, sólo se considerará la profilaxis en situaciones de riesgo como cirugía, trauma, inmovilización prolongada, etc. En caso de embarazadas que cumplan estos criterios de riesgo, se efectuará profilaxis durante el embarazo y el postparto inmediato, hasta completar seis a ocho semanas postparto (15, 64).

El estudio debe extenderse a los familiares más cercanos, con el fin de detectar precozmente el riesgo de trombosis y prevenirla, especialmente en situaciones de alto riesgo.

Conclusiones

La RPCa es la causa más importante de trombofilia congénita. Su frecuencia no ha sido definida en la población colombiana con enfermedad tromboembólica, pero la importancia del diagnóstico por sus implicaciones clínicas, requiere una mayor atención de los médicos que tratan trombosis de cualquier localización (65, 66).

Es necesario dar prioridad diagnóstica a los pacientes que presenten episodios recurrentes de trombosis, localizaciones no frecuentes de trombosis (cerebral, hepática, portal, retiniana); antecedentes de trombosis intrafamiliar y en general cualquier paciente joven con trombosis sin factores de riesgo conocidos. Estas pueden ser venosas o arteriales, ya que aunque son más frecuentes las venosas por trombofilia congénita, también se han descrito casos de locali-

zación arterial, o venosa y arterial simultáneas.

La determinación de RPCa se impone en pacientes que van a recibir anticoncepción oral y que presentan antecedentes de trombosis personales o familiares. El riesgo elevado de trombosis en homocigotas para el factor V de Leiden, sugieren un manejo profiláctico durante el embarazo, lo que aún no ha sido claramente indicada en heterocigotas.

La prueba de tamizaje más útil es la modificada, que comporta una fase con plasma deficiente en factor V, ya que se correlaciona en forma predictiva con la presencia de la mutación del factor V. Sin embargo, para establecer los valores de RPCa con las pruebas funcionales, se recomienda inicialmente la comparación con las pruebas de biología molecular, que permitan definir los rangos para cada laboratorio.

La RPCa ha demostrado ser una patología frecuente e importante, que requiere ser estudiada ampliamente con el fin de detectarla y prevenir las graves complicaciones que puede ocasionar.

Abstract

Resistance to activated protein C (APC) was recently reported as the most important cause of inherited thromboembolism. In most of the cases the APC resistance is due to a point mutation in the factor V gene, which is a substitution of arginine (R) at position 506 by glutamine (Q): FVa: Q⁵⁰⁶, producing a factor Va partially resistant to cleavage by the activated protein C. The factor Va remains active increasing the risk for thrombosis specially in homozygous FVa: Q⁵⁰⁶ individuals. An APC resistance test

is the main test in every patient with thrombosis without a known risk factor or with recurrent thrombosis. In patients with diagnosis of APC resistance, prophylactic anticoagulation may be needed for special thrombotic circumstances like surgery, long rest, pregnancy. Oral contraception is contraindicated. There is a higher incidence of thrombosis in younger people when APC resistance is associated with other inherited deficiencies like protein C or protein S deficiency.

Referencias

1. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrhag* 1965; **13**: 516-530.
2. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleis AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; **68**: 1370-1373.
3. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1984; **74**: 2082-2088.
4. 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.
5. Dahlbäck B. Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood* 1995; **85**: 607-614.
6. Dahlbäck B. The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis. *Thromb Res* 1995; **77**: 1-43.
7. Shen L, Dahlbäck B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of Factor VIIIa. *J Biol Chem* 1994; **269**: 18735-18738.
8. Varadi K, Rosing J, Tans G, Schwartz HP. Influence of Factor V and Factor Va on APC-induced cleavage of human factor VIII. *Thromb Haemost* 1995; **73**: 730-731.
9. 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.
10. Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernández JA, Griffin JH, Evatt BL. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 1994; **343**: 1362-63.
11. 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.
12. Voorberg J, Roelse J, Koopman R, Buller H, Berends F, Ten Cate JW, Mertens K, Van Mourik JA. Association of idiopathic thromboembolism with single point mutation at Arg 506 of Factor V. *Lancet* 1994; **343**: 1535-1536.
13. Engel H, Zwang L, Van Vliet HHDM, Michiels JJ, Stibbe J, Lindermans J. Phenotyping and genotyping of coagulation factor V Leiden. *Thromb Haemost* 1996; **75**: 267-269.
14. Dahlbäck B, Zuller B, Hillarp A. Inherited resistance to activated protein C caused by presence of the FV:Q506 allele as a basis of venous thrombosis. *Haemostasis* 1996; **26** (Suppl 4): 301-314.
15. Dahlbäck B. Resistance to Activated Protein C caused by the Factor V: R 506Q Mutation is a common risk factor for Venous Thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 483-488.
16. Kane WH, Davie EW. Blood coagulation factors V and VIII: Structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood* 1988; **71**: 539-555.
17. Heeb MJ, Kojima V, Greengard JS, Griffin JH. Activated protein C resistance: Molecular mechanisms based on studies using purified Gln506-factor V. *Blood* 1995; **85**: 3405-3411.
18. Kalafatis M, Haley PE, LU D, Bertina RM, Long GL, Mann KG. Proteolytic events that regulate factor V activity in whole plasma from normal and activated protein C (APC)-resistant individuals during clotting: an insight into the APC-resistance assay. *Blood* 1996; **87**: 4695-4707.
19. Rosendaal FR, Köster T, Vandembroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; **85**: 1504-8.
20. Samama MM, Simon D, Horellou MH, Trossaert M, Elalamy I, Conard J. Diagnosis and clinical characteristics of inherited activated protein C resistance. *Haemostasis* 1996; **26** (Suppl 4): 315-330.
21. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde F, Briet E, Vandembroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor response to activated protein C: Leiden thrombophilia study. *Lancet* 1993; **342**: 15503-15506.
22. Svensson PJ, Dahlbäck B. Resistance to activated Protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; **330**: 517-521.
23. Griffin JH, Evatt BL, Wideman C, Fernández JA. Anticoagulant protein C pathway defective in a majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; **82**: 1989-1993.
24. Zöller B, Svensson PJ, He X, Dahlbäck B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone

- families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest* 1994; **94**: 2521-2524.
25. **Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP.** Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995; **332**: 912-917.
 26. **Rees DC, Cox M, Clegg JB.** World distribution of Factor V Leiden. *Lancet* 1995; **346**: 1133-1134.
 27. **Zoller B, Dahlbäck B.** Resistance to activated protein C caused by a factor V gene mutation. *Current Opinion in Hematology* 1995; **2**: 358-364.
 28. **Beauchamp NJ, Daly ME, Hampton KK, Cooper PC, Preston E, Peake IR.** High prevalence of a mutation in the factor V gene within the UK population: Relationship to activated protein C resistance and familial thrombosis. *Br J Haematol* 1994; **88**: 219-222.
 29. **De Maat MPM, Klufft C, Jespersen J, Gram J.** World distribution of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1996; **347**: 58.
 30. **Bertina RM.** Laboratory Diagnosis of Resistance to Activated Protein C (APC-Resistance). *Thromb Haemost* 1977; **78**: 478-482.
 31. **Bertina RM, Reitsma PH, Rosendaal FR, Vandenbroucke JP.** Resistance to activated protein C and factor V Leiden as risk factors for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1995; **74**: 449-453.
 32. **Jorquera JI, Montoro JM, Fernández MA, Aznar JA, Aznar J.** Modified test for activated protein C resistance. *Lancet* 1994; **344**: 1162-1163.
 33. **Hopmeier P, Krugluger W.** Factor V Leiden and thrombophilia. *N Engl J Med* 1995; **332**: 1381-1382.
 34. **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.
 35. **Voelkerding KV, Wu L, Williams EC, Hoffman SM, Sabatini LM, Borchering WR, Huber S.** Factor V R506Q gene mutation analysis by PCR-RFLP. *Am J Clin Pathol* 1996; **106**: 100-106.
 36. **Biron C, Lamarti H, Schued JF, Jeanjean P, Masméjean C, Claustres M, Aguilar-Martínez P.** Diagnosis strategies in activated protein C resistance: is genotyping still necessary? *Clin Lab Haem* 1997; **19**: 67-71.
 37. **Zehnder JL, Benson RC.** Sensitivity and specificity of the APC resistance assay in detection of individuals with factor V Leiden. *Am J Clin Pathol* 1996; **106**: 107-111.
 38. **Pipe SW, Schmaier AH, Nichols WC, Ginsburg D, Bozynski MEA, Castle VP.** Neonatal purpura fulminans in association with factor V R506Q mutation. *J Pediatr* 1996; **128**: 706-709.
 39. **Trossaert M, Conard J, Horellou MH, Samama MM, Ireland H, Bayston TA, Lane DA.** Modified APC resistance assay for patients on oral anticoagulants. *Lancet* 1994; **344**: 1709.
 40. **Zöller B, Hölm J, Svensson PJ, Dahlbäck B.** Elevated levels of prothrombin fragment 1 + 2 in plasma from patients with inherited APC-resistance and/or protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1996; **75**: 270-274.
 41. **Forsyth PD, Dolan G.** Activated protein C resistance in cases of cerebral infarction. *Lancet* 1995; **345**: 795.
 42. **Fischer M, Fernández JA, Ameriso SF, Xie D, Gruber A, Paganini-Hill A, Griffin JH.** Activated protein C resistance in ischemic stroke not due to factor V Arginine 506—Glutamine mutation. *Stroke* 1996; **27**: 1163-1166.
 43. **Simioni P, Scudeller A, Girolam A.** Factor V Leiden and thrombophilia. *N Engl J Med* 1995; **332**: 1382.
 44. **März W, Seydewitz H, Winkelmann B, Chen M, Nauck M.** Mutation in coagulation factor V associated with resistance to activated protein C in patients with coronary artery disease. *Lancet* 1995; **345**: 526-7.
 45. **Van Der Boom JG, Bots ML, Haverkate F, Slagboom E, Meijer P, Jong PTVM, Hofman A, Grobbee DE, Klufft C.** Reduced response to activated protein C is associated with increased risk for cerebrovascular disease. *Ann Intern Med* 1996; **125**: 265-269.
 46. **Zuber M, Toulon P, Marnet L, Mas JL.** Factor V Leiden mutation in cerebral venous thrombosis. *Stroke* 1996; **27**: 1721-1723.
 47. **Samaha 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.
 48. **Rintelen C, Pabinger I, Knobl P, Lechner K, Mannhalter C.** Probability of recurrence of thrombosis in patients with and without factor V Leiden. *Thromb Haemost* 1996; **75**: 229-32.
 49. **Greengard JS, Eichinger S, Griffin JH, Bauer KA.** Brief report: variability of thrombosis among homozygous siblings with resistance to activated protein C due to an Arg—Gln mutation in the gene for factor V. *N Engl J Med* 1994; **331**: 1559-62.
 50. **Koelmann BPC, Van Rumpff D, Hamulyak K, Reitsma PH, Bertina RM.** Factor V Leiden. An additional risk factor for thrombosis in protein S deficiency families? *Thromb Haemost* 1995; **74**: 580-583.
 51. **Zöller B, Bernsdotter A, García de Frutos P, Dahlbäck B.** Resistance to activated protein C as an additional risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood* 1995; **85**: 3518-3523.
 52. **Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR.** Increased risk of venous thrombosis in oral contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994; **344**: 1453-1457.
 53. **Bloemenkamp KWM, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Buller HR, Vandenbroucke JP.** Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third generation progestagen. *Lancet* 1995; **346**: 1593-6.
 54. **Lidegaard O, Milsom I.** Oral contraceptives and venous thrombosis. *Lancet* 1997; **349**: 1621-1623.
 55. **Vandenbroucke JP, Rosendaal FR.** End of the line for third-generation pill" controversy? *Lancet* 1997; **349**: 1113-1114.
 56. **Rai R, Regan L, Chitolie A, Donald JG, Cohen H.** Placental thrombosis and second trimester miscarriage in association with activated protein C resistance. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; **103**: 842-844.
 57. **Hellgren M, Svensson PJ, Dahlbäck B.** Resistance to activated protein C as a basis for venous thromboembolism associated with pregnancy and oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 1995; **173**: 210-203.
 58. **Bokarewa MI, Bremme K, Blombäck M.** Arg506-Gln mutation in factor V and risk of thrombosis during pregnancy. *Br J Haematol* 1996; **92**: 473-8.
 59. **Hille ETM, Westendorp RGJ, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR.** Mortality and causes of death in families with the factor V Leiden mutation (Resistance to activated protein C). *Blood* 1997; **89**: 1963-1967.
 60. **Mari D, Mannucci PM, Duca F, Bertolini S, Franceschi C.** Mutant factor V (Arg 506 Gln) in healthy centenarians. *Lancet* 1996; **347**: 1044.
 61. **Launbjerg J, Egeblad H, Heaf J, Nielsen NH, Fugleholm AM, Ladefoged K.** Bleeding complications to oral anticoagulant therapy: Multivariate analysis of 1010 treatment years in 551 patients. *J Intern Med* 1991; **229**: 351.
 62. **Meer Van Der FJM, Rosendaal FR, Vandenbroucke JP, Briet E.** Bleeding complications in oral anticoagulant therapy. An analysis of risk factors. *Arch Intern Med* 1993; **153**: 1557.
 63. **Nichols WC, Amano K, Cacheris PM, Figueiredo MS, Michaelides K, Schwaab R, Hover L, Kaufman RJ, Ginsburg D.** Moderation of hemophilia A phenotype by the factor V R506Q mutation. *Blood* 1996; **88**(15): 1183-1187.
 64. **Bauer KA.** Management of patients with hereditary defects predisposing to thrombosis including pregnant women. *Thromb Haemost* 1995; **74**: 94-100.
 65. **Florell SR, Rodgers GM.** Utilization of testing for activated protein C resistance in a reference laboratory. *Am J Clin Pathol* 1996; **106**: 248-252.
 66. **Moerloose P, Mannucci PM.** Thrombophilia: which test for which patient? Meet the expert sessions of the second European Haematology Association, 1996: 32-36.