

Diagnóstico molecular de factores protrombóticos: primeros casos de factor V Leiden y protrombina 20210A en Uruguay

*Dra. Daniela Lens¹, Dra. Ana María Otero², Dra. Graciela Cotic³,
Lic. Sandra Henry⁴, Dra. Andrea Díaz⁵, Tec. Datevig Attarian⁶,
Dra. Caroline Agorio⁷, Dra. Silvia Pierrri⁸*

Resumen

La enfermedad tromboembólica constituye un gran problema clínico debido a su alta incidencia y a su importante morbilidad. Desde el punto de vista patogénico, esta es una enfermedad multifactorial que resulta de la interrelación entre factores ambientales y genéticos.

Durante los últimos años se han identificado varios factores genéticos que predisponen a la trombosis, sin embargo hasta el momento sólo dos de ellos tienen una alta prevalencia: el factor V Leiden y la protrombina 20210A.

El FV Leiden es el factor de riesgo genético más frecuentemente encontrado en las trombosis venosas. Corresponde a una mutación en el gen del factor V, que determina una resistencia a la inactivación del factor V activado por la proteína C activada. La incidencia encontrada en pacientes con trombosis venosa es de 20%, determinando para aquellos portadores heterocigotos un aumento de siete veces en el riesgo de trombosis.

La variante alélica protrombina 20210A es una mutación en el gen de la protrombina asociada a un aumento de la concentración plasmática de protrombina y que confiere un mayor riesgo de trombosis venosa a los individuos portadores de esta mutación. Se ha observado una incidencia de 18% en pacientes con historia familiar de trombosis, mientras que en sujetos sanos es de aproximadamente 2%. Debido a que ambos defectos son causados por una mutación puntual, el análisis molecular es considerado un pilar diagnóstico.*

La alta prevalencia de estas alteraciones genéticas encontrada a nivel mundial, conjuntamente con el riesgo trombótico que conllevan, pone de manifiesto la importancia de este estudio en nuestro país.

En este trabajo se discuten los primeros casos diagnosticados como portadores de estas mutaciones en Uruguay.

Palabras clave: *Trombosis - genética
Factor V
Protrombina
Factores de riesgo
Uruguay*

1. Prof. Adjunto, Departamento Básico de Medicina.
2. Prof. Agregado, Cátedra de Hematología Clínica.
3. Médico Hematólogo, CEATH, Hospital Italiano.
4. Licenciado en Biología, Departamento Básico de Medicina.
5. Médico Hematólogo.
6. Técnico de Laboratorio, CEATH, Hospital Italiano.
7. Ayudante, Departamento Básico de Medicina.
8. Asistente de Laboratorio Clínico.
Departamento e Institución Responsables:
Departamento Básico de Medicina, Facultad de Medicina
Cátedra de Hematología Clínica, Facultad de Medicina

CEATH, Hospital Italiano.

Correspondencia: Dra. Daniela Lens, Departamento Básico de Medicina, Piso 15, Hospital de Clínicas, Avda. Italia s/n, Montevideo CP 1600, Uruguay.

Subvencionado parcialmente por: Fundación Manuel Pérez con financiación externa Rhône-Poulenc

* "Point-mutation", si bien los autores optaron por la traducción mutación puntual, creemos que se adapta mejor, dado el significado, mutación de punto.

Presentado: 13/8/99

Aceptado: 19/11/99

Introducción

La trombosis venosa constituye un problema para la salud debido a que es una enfermedad frecuente presentando una incidencia anual de aproximadamente uno cada 1.000 habitantes, con importante morbilidad y considerable mortalidad por tromboembolismo pulmonar. La alternativa más lógica para su abordaje es la profilaxis. La identificación de los pacientes con riesgo aumentado de desarrollar complicaciones tromboembólicas y el tratamiento profiláctico apropiado deben contribuir a disminuir la morbimortalidad relacionadas. Los factores de riesgo para esta enfermedad incluyen tanto factores hereditarios como adquiridos. La importancia de los factores genéticos es demostrada por el hecho que en 20%-40% de los pacientes existen antecedentes familiares de la enfermedad.

Durante los últimos años se han identificado varios factores genéticos que predisponen a la trombosis, sin embargo hasta el momento sólo dos de ellos tienen una alta prevalencia: el factor V Leiden y la protrombina 20210A.

Debido a que ambos defectos son causados por una mutación puntual, el análisis genético es considerado la base del diagnóstico de laboratorio.

La alta prevalencia de estas alteraciones genéticas encontrada a nivel mundial, conjuntamente con el riesgo trombótico que conllevan, pone de manifiesto la importancia de este estudio en nuestro país. Esto se está llevando a cabo, por un lado, mediante un convenio entre el Departamento Básico de Medicina de la Facultad de Medicina, Universidad de la República y el Centro de Estudio de Afecciones de Hemostasis y Trombosis (CEATH) del Hospital Italiano para el análisis de estos factores en pacientes con diagnóstico presuntivo de trombofilia. Por otra parte, el estudio de la prevalencia de estos factores en la población uruguaya sana se está realizando mediante un proyecto otorgado por la Fundación Manuel Pérez con financiación externa de Rhône-Poulenc.

En este trabajo, después de una breve introducción sobre ambos factores, analizaremos las características clínicas y de laboratorio de los primeros casos encontrados con mutaciones para el FV Leiden y el FII 20210A.

Resistencia a la proteína C activada y factor V Leiden (FV G1691A)

La proteína C activada (PCa) es una serino-proteasa con potentes propiedades anticoagulantes que actúa limitando la formación del trombo mediante la inactivación proteolítica del FVa y del FVIIIa.

El fenómeno de la resistencia a la PCa (RPCA) fue descubierto hace cinco años por Dahlback y colegas⁽¹⁾. Un año después se identificó el defecto molecular como una mutación puntual en el factor V (FV)⁽²⁾. La mutación es

una sustitución del nucleótido G por el nucleótido A en el nucleótido 1691. Esto determina el reemplazo en la proteína de una arginina en la posición 506 por una glutamina^(3,4). Por tanto, el FV mutado puede denominarse como FV G1691A o FV R506Q, aunque es comúnmente denominado FV Leiden.

Normalmente el FVa se inactiva mediante clivación en la posición Arg506 seguida por un segundo clivaje en la posición Arg306. En el caso del FV Leiden, no ocurre el clivaje en la Arg 506 determinando que el proceso de clivaje en la posición Arg306 sea diez veces más lento, lo que origina el fenómeno de la resistencia a la actividad anticoagulante de la PCa⁽⁵⁾.

La prevalencia de este factor es de aproximadamente 5% en la población caucásica europea y en la norteamericana, siendo de considerable menor frecuencia o prácticamente inexistente en individuos de raza negra, en asiáticos y en indígenas americanos. Aun en las sociedades occidentales muestra cierta variabilidad (revisión en^(6,7)). La más alta prevalencia se describió en Suecia (15%). En Alemania también se observó una elevada prevalencia (10%). Holanda, Reino Unido y Estados Unidos presentaron una prevalencia de alrededor de 3%-5%, mientras que en España e Italia se observó una prevalencia de 2%. En países sudamericanos se ha descrito una prevalencia similar a la hallada en la población caucásica occidental: Venezuela (Valencia) 1,6%, Argentina (Buenos Aires) 5,1%, Costa Rica 2,0%, Brasil (San Pablo) 2% y Chile (Santiago), 3,8%⁽⁸⁻¹⁰⁾. Es importante recalcar que la mayoría de estos estudios se realizaron mediante estudio funcional, no habiéndose realizado un análisis genotípico para demostrar el FV mutado.

El FV Leiden se ha encontrado en alrededor de 20% de los casos con trombosis venosa profunda (TVP) y de 50% de los casos de TVP donde existe historia familiar⁽¹¹⁻¹⁴⁾. Según The Leiden Trombophilia Study, el riesgo relativo de trombosis conferido por este factor es de 7 para los portadores heterocigotos y de 80 en los homocigotos⁽¹²⁾.

El test inicial para la RPCA es un estudio funcional que se basa en la comparación del tiempo de coagulación APTT (activated partial thromboplastin time) en el plasma del paciente en presencia y ausencia de una cantidad estandarizada de PCa exógena (revisado en⁽⁶⁾). El fenotipo de la RPCA se caracteriza por una mínima prolongación del APTT en respuesta a la PCa. Este test tiene una sensibilidad y especificidad para el FV Leiden de 85%-90%. Una desventaja importante que presenta este tipo de test es que no puede ser utilizado para el análisis de pacientes en tratamiento con anticoagulantes.

El test más directo para la identificación del FV Leiden es el análisis genético que incluye la utilización de ADN genómico como molde para la amplificación de fragmento del gen del FV que contiene la mutación. Se puede detec-

tar la presencia o ausencia de la mutación mediante restricción enzimática, uso de sondas alelo-específicas o secuenciación directa del fragmento de PCR amplificado de manera de demostrar la sustitución G por A en la posición 1691^(2,16). Una ventaja adicional frente al estudio funcional es que el análisis del ADN permite identificar individuos normales, heterocigotos y homocigotos.

Variante 20210A de la protrombina. Factor II G20210A

La protrombina es el precursor de la trombina, el efector final de la cascada de la coagulación que conduce a la formación de fibrina. La protrombina es una enzima clave en el equilibrio entre procoagulación y anticoagulación porque promueve la coagulación por retroalimentación positiva y también promueve la anticoagulación mediante la activación de la vía de la proteína C⁽¹⁷⁾. Recientemente se ha descrito una variante genética del gen de la protrombina asociada con un aumento del riesgo de trombosis. Esta mutación está localizada en la región 3'-no codificante (3'UTR) de este gen y consiste en la sustitución del nucleótido G por el nucleótido A en la posición 20210⁽¹⁸⁾.

Desde el punto de vista funcional se ha demostrado que esta mutación se asocia con niveles plasmáticos aumentados de protrombina sugiriendo que el aumento de riesgo asociado con el alelo 20210A puede estar relacionado con el aumento de la concentración plasmática de esta proteína⁽¹⁸⁾.

Esta mutación ha sido encontrada en 1%-2% de individuos sanos, 6,2% de pacientes con un primer episodio de TVP y 18% de los pacientes con trombofilia familiar no explicada⁽¹⁸⁻²¹⁾. Los estudios caso/control permitieron establecer un riesgo relativo de trombosis para la presencia de este alelo de 2,8. Es interesante hacer notar que el FII 20210A se ha encontrado asociado con un aumento del riesgo de infarto de miocardio en mujeres jóvenes⁽²²⁾. Sin embargo, al igual que ocurre con el FV Leiden, el rol de este factor en la trombosis arterial es controvertido.

El diagnóstico de laboratorio para demostrar la presencia de protrombina 20210A está basado únicamente en el análisis de ADN. Esta mutación es el primer ejemplo de un defecto genético de la coagulación que no puede ser diagnosticado por pruebas funcionales o inmunológicas. La detección de esta variante alélica se realiza mediante técnicas de genética molecular, las cuales se basan en la amplificación del ADN por PCR seguida de digestión enzimática (PCR-RFLP)⁽¹⁸⁾.

Material y método

Todos los procedimientos realizados concuerdan con las normas éticas según la Declaración de Helsinki de 1975 en la versión revisada de 1983.

Extracción de DNA

El DNA genómico fue extraído de sangre periférica total citratada mediante técnicas convencionales. Al llegar al laboratorio, las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2.500 rpm durante diez minutos. El *buffy coat* fue colectado y guardado a -20°C hasta la extracción del ADN.

Detección del FV Leiden

El factor V Leiden se detectó mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de digestión con la enzima de restricción *MnII* según el método publicado por Beauchamp NJ y colaboradores en 1994⁽¹⁶⁾. La amplificación por PCR se realizó utilizando un par de nucleótidos cebadores (Gibco BRL, UK) que flanquean un fragmento de 147 pares de bases (pb) que codifican el sitio de clivaje de la proteína C activada. (Primer 1: 5'-CAT GAG AGA CAT CGC CTC TG (nucleótidos 1623-1642) y primer 2: 5'-GAC CTA ACA TGT TCT AGC CAG AAG (intrón 10 nucleótido 45-68). Posteriormente se realizó la incubación a 37°C del producto de PCR con la enzima *MnII* (New England Biolabs, Estados Unidos). El producto digerido fue analizado en gel de agarosa al 2%, habiéndose detectado las bandas mediante tinción con bromuro de etidio. Esta digestión origina fragmentos de 25, 37 y 85 pb cuando A está presente en la posición 1691 (alelo normal) mientras que la sustitución por una G en esta posición (alelo mutado) produce dos fragmentos de 25 y 122 pb, ya que esta mutación determina la pérdida de un sitio de restricción para la enzima *MnII* (figura 1).

Detección de la variante FII 20210A

Este análisis se realiza mediante amplificación por PCR de un fragmento de la región 3'UT de la protrombina. Para ello se utilizó un primer mutagénico, o sea que se diseñó un nucleótido cebador con una sustitución en un nucleótido de manera que la combinación de esta sustitución con la anomalía genética en la posición 20210 origine un nuevo sitio de restricción para la enzima *HindIII* según el método publicado por Poort SR y colaboradores⁽¹⁸⁾.

Utilizando los nucleótidos cebadores: 5'-TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC (nucleótidos 19889-19908) y 5'-ATA GCA CTG GGA GCA TTG AA*G C (nucleótidos 20233-20212) (Gibco BRL, Estados Unidos), se amplificó por PCR un fragmento de 345 pb. El asterisco señala el nucleótido modificado. El alelo normal carece de sitio de restricción *HindIII* (New England Biolabs, Estados Unidos) y, por tanto, se observa en el gel de electroforesis un solo fragmento de 345 pb. En el caso de presentar un alelo mutado, éste origina un nuevo sitio de restricción determinando la producción de dos fragmentos de 322 pb y de

23 pares de bases después de la digestión enzimática (figura 1).

Análisis de los casos

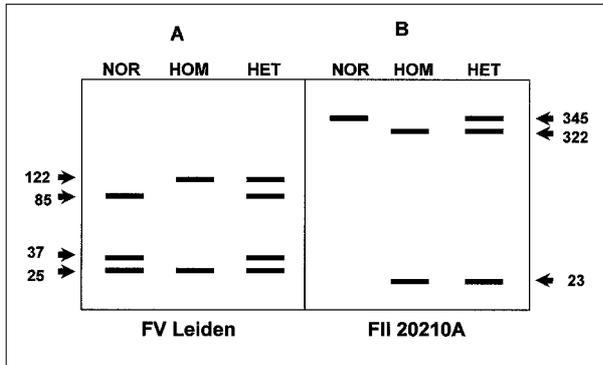


Figura 1. Estudio genético del FV Leiden y FII 20210A por PCR-RFLP. Representación esquemática
A: En el caso del FV Leiden, después de la extracción y amplificación, el producto de PCR se cliva en fragmentos de distintos tamaños al ser digerido por la enzima de restricción *Mn I*. La identificación del genotipo se hace según los fragmentos presentes, así en los sujetos sin mutación se observa en el gel de electroforesis, fragmentos de 25, 37 y 85 pb, mientras que los sujetos homocigotos para la mutación presentan fragmentos de 25 y 122 pb. En los portadores heterocigotos, el patrón de bandas en la electroforesis muestra fragmentos de 25, 37, 85 y 122 pb.
B: En el caso del FII 20210A, se realiza PCR-RFLP utilizando la enzima *HindIII*. En el caso de sujetos sin mutación se observa un fragmento de 345 pb. En los portadores homocigotos se observan fragmentos de 322 y 23 pb, mientras que los heterocigotos presentan fragmentos de 345, 322 y 23 pb.

Caso 1

Paciente de 35 años, de sexo femenino, quien presentó a los 29 años una trombosis venosa axilar derecha sin otros factores de riesgo, que se trató con heparina y warfarina por seis meses. A los 33 años, presentó una nueva trombosis venosa axilar izquierda. Fue referida al CEATH del Hospital Italiano, para estudio de su trombofilia donde se investigaron la proteína C, proteína S, inhibidor del activador del plasminógeno, (PAI), anticuerpos anticardiolipina (ACA), anticuerpo lúpico (AL), y homocisteína, cuyos valores resultaron normales.

El estudio molecular del FV Leiden y el FII 20210A fue realizado en el Departamento Básico de Medicina de la Facultad de Medicina con la metodología detallada anteriormente. En el caso del FV Leiden se observó en el gel de agarosa un patrón de bandas correspondientes a un genotipo heterocigoto, mientras que el FII 20210A fue normal (figura 2).

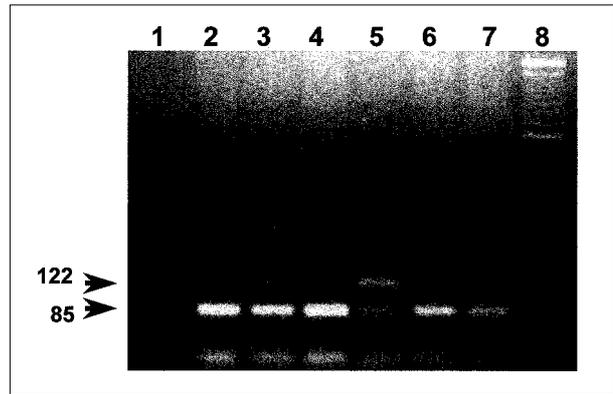


Figura 2. Detección del FV G1691A por PCR-RFLP en el caso # 1. Carril 1: control heterocigoto, carriles 2, 3, 4, 6 y 7: casos portadores de genotipos normales. Carril 8: marcador de peso molecular. Carril 5: caso #1. Se observan dos bandas de 122 y 85 pb que corresponden a un genotipo heterocigoto.

Caso 2

Paciente de 59 años, de sexo masculino, quien desde los 32 años comienza con fenómenos de trombosis venosas profundas y superficiales de ambos miembros inferiores sin otros factores de riesgo clínicos asociados. En una ocasión se complicó con un tromboembolismo pulmonar.

Es enviado al CEATH del Hospital Italiano para el estudio de su enfermedad donde se analizó: proteína C, proteína S, PAI, ACA, AL y homocisteína, que resultaron normales.

Como se ilustra en la figura 3 el estudio molecular realizado en el Departamento Básico de Medicina permitió detectar un genotipo heterocigoto para el FII 20210A, mientras que el FV Leiden resultó normal.

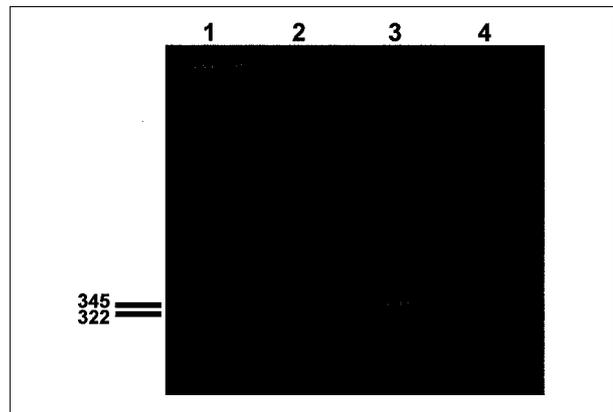


Figura 3. Análisis del FII 20210A en el caso # 2. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control heterocigoto, carril 3: control normal, carril 4: caso # 2. Se observan en este caso dos bandas de 345 y 322 pares de bases, lo que permite realizar el diagnóstico de portador heterocigoto para esta mutación.

Conclusiones

La trombosis es un problema clínico frecuente y de gran morbilidad donde el FV Leiden o el Factor II 20210A, o ambos, desempeñan un importante papel en una gran proporción de los casos. Estos hechos ponen de manifiesto la importancia del estudio de estos factores en nuestro país. En este artículo hemos descrito desde un punto de vista clínico y paraclínico los primeros dos casos diagnosticados en Uruguay de portadores de mutaciones en el FV o en el FII.

Agradecimientos

A los doctores K. Brown y T. Baglin (Addenbrooks Hospital, University of Cambridge, UK) por la colaboración técnica y por los controles ofrecidos.

A la doctora Nora Artagaveytia por el ofrecimiento de su laboratorio para realizar parte de este proyecto.

El presente trabajo fue financiado parcialmente por la Fundación Manuel Pérez y Laboratorio Rhône-Poulenc.

Summary

Thromboembolic disease is an important clinical issue due to its high incidence and morbidity. It is considered a multifactorial disease as a result of the existing relations between environmental and genetic factors.

Despite the fact that many genetic factors that contribute to develop thrombosis have been identified over the last few years, only two of them show a high prevalence: factor V Leiden and prothrombin 20210A.

Factor V Leiden is the most frequent genetic factor found in venous thrombosis. It corresponds to a mutation in coagulation factor V, which results in resistance to activated protein C. It is found in 20 percent of patients with venous thrombosis, and in heterozygous carriers risks for thrombosis are 7 times higher.

The allelic variant of the prothrombin 20210A is a mutation prothrombin gene associated with an increase of prothrombin plasma concentration producing a higher risk for venous thrombosis in carriers of this mutation. Incidence found in patients with familial history of thrombosis in 18 percent, as compared with 2 percent among normal subjects. Since both abnormalities are caused by point mutation, molecular analysis is of a major diagnostic value.

The worldwide high prevalence of these genetic abnormalities as well as the associated risk for thrombosis, clearly show the importance of this study in our country.

The first cases of carriers of these mutations in Uruguay are discussed in the article.

Résumé

La maladie thromboembolique entraîne un problème clinique par sa haute incidence et par sa grande morbidité. Du point de vue pathogénique, c'est une maladie multifactorielle résultant de l'interaction entre des facteurs de l'entourage et génétiques.

Pendant les dernières années, on a identifié plusieurs facteurs génétiques prédisposant à la thrombose, dont seulement deux ont une prévalence importante: le facteur V Leiden et la prothrombine 20210A.

Le Facteur V Leiden est le facteur de risque génétique le plus fréquent aux thromboses veineuses. Il correspond à une mutation au gène du facteur V, qui détermine une résistance à l'inactivation du Facteur V activé par la protéine C activée. L'incidence trouvée chez des patients avec thrombose veineuse est de 20%, déterminant une augmentation de 7 fois du risque de thrombose, pour les porteurs hétérozygotes.

La variante allèle prothrombine 20210A est une mutation du gène de la prothrombine associée à une augmentation de la concentration plasmatique de prothrombine, ce qui porte un plus grand risque de thrombose veineuse aux individus porteurs de cette mutation. On a signalé une incidence de 18% chez des patients ayant une histoire familiale de thrombose, tandis que chez des individus sains elle est de 2%. C'est parce que les deux défauts sont provoqués par une mutation ponctuelle que l'analyse moléculaire en est un pilier diagnostique.

La haute prévalence de ces troubles génétiques constatée dans le monde entier, avec aussi le risque thrombotique qu'elles entraînent, révèle de l'importance de cette étude dans notre pays.

Dans ce travail-ci, on discute les premiers cas diagnostiqués comme porteurs de ces mutations en Uruguay.

Bibliografía

1. **Dahlback B, Carlsson M, P.J.S.** 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: 1004-8.
2. **Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al.** Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-7.
3. **Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernández JA, Griffin JH, Evatt B.** Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 1994; 343: 1361-2.
4. **Voorberg J, Roelse J, Koopman R, Buller H, Berends F, ten Cate JW, et al.** Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506 of factor V. *Lancet* 1994; 343: 1535-6.
5. **Kalafatis M, Bertin RM, Rand MD, Mann KG.**

- Characterization of the molecular defect in factor VR506Q. *J Biol Chem* 1995; 270: 4053-7.
6. **Dahlback B.** Resistance to activated protein C as risk factor for thrombosis: molecular mechanisms, laboratory investigation, and clinical management. *Semin Hematol* 1997; 34: 217-34.
 7. **Rees DC.** The population genetics of factor V Leiden (Arg506Gln). *Br J Haematol* 1996; 95: 579-86.
 8. **Herrmann FH, Koesling M, Schroder W, Altman R, Jimenez Bonilla R, Lopaciuk S, et al.** Prevalence of factor V Leiden mutation in various populations. *Genet Epidemiol* 1997;14: 403-11.
 9. **Pereira J, Quiroga T, Goycoolea M, Muñoz B, Hidalgo P, Kaltwasser G, et al.** Activated C protein resistance: laboratory study and prevalence of the defect in the Chilean population. *Rev Med Chile* 1996; 124: 663-8.
 10. **Arruda VR, Annichino Bizzacchi JM, Costa FF, Reitsma PH.** Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a Brazilian population. *Am J Hematol* 1995; 49: 242-3.
 11. **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: 449-53.
 12. **Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH.** High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85: 1504-8.
 13. **Koster T, Rosendaal FR.** Activated protein C resistance in venous thrombosis. *Lancet* 1994; 343: 541.
 14. **Svensson PJ, Dahlback B.** Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 330: 517-22.
 15. **Koeleman BP, Reitsma PH, Bertina RM.** Familial thrombophilia: a complex genetic disorder. *Semin Hematol* 1997; 34: 256-64.
 16. **Beauchamp NJ, Daly ME, Hampton KK, Cooper PC, Preston FE, Peake IR.** High prevalence of a mutation in the factor V gene within the U.K. population: relationship to activated protein C resistance and familial thrombosis. *Br J Haematol* 1994; 88: 219-22.
 17. **Jackson C.** Physiology and biochemistry of prothrombin. In: Bloom A, Forbes C, Thomas D, Tuddenahm E, eds. *Haemostasis and Thrombosis*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994: 397.
 18. **Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM.** A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-703.
 19. **Arruda VR, Annichino Bizzacchi JM, Goncalves MS, Costa FF.** Prevalence of the prothrombin gene variant (nt 20210A) in venous thrombosis and arterial disease. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1430-3.
 20. **Makris M, Preston FE, Beauchamp NJ, Cooper PC, Daly ME, Hampton KK, et al.** Co-inheritance of the 20210A allele of the prothrombin gene increases the risk of thrombosis in subjects with familial thrombophilia. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1426-9.