

DEPARTAMENT DE BIOQUIMICA

CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES IDENTIFICADAS
EN EL SISTEMA DE LA PROTEÍNA C: ASOCIACIÓN CON
EL RIESGO TROMBÓTICO Y ESTUDIO DE SU
IDENTIFICACIÓN CON OTROS DEFECTOS
TROMBOFÍLICOS.

SILVIA NAVARRO ROSALES

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 16 d'abril de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. José Cabo Soler
- Dr. Edelmiro Réganon Salvador
- Dr. Vicente Vicente García
- Dr. José Hermida Santos
- Dr. Ramiro Jover Atienza

Va ser dirigida per:

Dr. Francisco España Furió

Dra. Amparo Estellés Cortés

Dra. Pilar Medina Badenes

©Copyright: Servei de Publicacions
Silvia Navarro Rosales

Dipòsit legal: V-3427-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7974-5

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



**CENTRO DE
INVESTIGACIÓN**
Unidad de Bioquímica

FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES IDENTIFICADAS
EN EL SISTEMA DE LA PROTEÍNA C: ASOCIACIÓN
CON EL RIESGO TROMBÓTICO Y ESTUDIO DE SU
INTERACCIÓN CON OTROS DEFECTOS
TROMBOFÍLICOS.

TESIS DOCTORAL
presentada por:

SILVIA NAVARRO ROSALES

VALENCIA, 2010

HOSPITAL UNIVERSITARIO LA FE
Centro de Investigación
Valencia

Don. FRANCISCO ESPAÑA FURIÓ, Doctor en Ciencias Químicas, y Jefe de Sección de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

CERTIFICA:

Que Dña. SILVIA NAVARRO ROSALES, Licenciada en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo mi dirección el trabajo experimental que conduce a la elaboración de la presente Tesis Doctoral, titulada:

“CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES IDENTIFICADAS EN EL SISTEMA DE LA PROTEÍNA C: ASOCIACIÓN CON EL RIESGO TROMBÓTICO Y ESTUDIO DE SU INTERACCIÓN CON OTROS DEFECTOS TROMBOFÍLICOS.”

Para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 12 de Febrero de dos mil diez.

Fdo: Dr. Francisco España Furió



HOSPITAL UNIVERSITARIO LA FE
Centro de Investigación
Valencia

Dña. AMPARO ESTELLÉS CORTÉS, Doctora en Medicina y Cirugía, y Médico Adjunto de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

CERTIFICA:

Que Dña. SILVIA NAVARRO ROSALES, Licenciada en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo mi dirección el trabajo experimental que conduce a la elaboración de la presente Tesis Doctoral, titulada:

“CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES IDENTIFICADAS EN EL SISTEMA DE LA PROTEÍNA C: ASOCIACIÓN CON EL RIESGO TROMBÓTICO Y ESTUDIO DE SU INTERACCIÓN CON OTROS DEFECTOS TROMBOFÍLICOS.”

Para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 12 de Febrero de dos mil diez.

Fdo: Dra. Amparo Estellés Cortés



**AGÈNCIA
VALENCIANA
DE SALUT**

HOSPITAL UNIVERSITARIO LA FE
Centro de Investigación
Valencia

Dña. PILAR MEDINA BADENES, Doctora en Biología, y Contratada Post-Doctoral de la Fundación para la Investigación del Hospital La Fe de Valencia.

CERTIFICA:

Que Dña. SILVIA NAVARRO ROSALES, Licenciada en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo mi dirección el trabajo experimental que conduce a la elaboración de la presente Tesis Doctoral, titulada:

“CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES IDENTIFICADAS EN EL SISTEMA DE LA PROTEÍNA C: ASOCIACIÓN CON EL RIESGO TROMBÓTICO Y ESTUDIO DE SU INTERACCIÓN CON OTROS DEFECTOS TROMBOFÍLICOS.”

Para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 12 de Febrero de dos mil diez.

Fdo: Dra. Pilar Medina Badenes

A mis padres,

a quienes les debo mi educación.

*Por vuestro apoyo, siempre,
vuestro cariño,
vuestro gran esfuerzo,
vuestros sabios consejos
vuestra infinita ayuda,
y sobre todo...
... gracias por convertirme en quien soy.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera nombrar al Dr. España, por haberme dirigido y acogido en su grupo, hace ya unos años, y abrirme las puertas del mundo de la investigación. Personalmente, al Paco responsable de enseñarme a trabajar con minuciosidad y constancia, y especialmente por preocuparse en que mi formación científica estuviese también en la asistencia a congresos, ya nacionales como internacionales, cursos y seminarios, así como formación en el extranjero.

También, agradecer a la Dra. Estellés su codirección e interés por hacerme ver que la fibrinólisis “también es un sistema de anticoagulación”, por sus correcciones y sugerencias, por aclarar mis dudas en la clínica. A nivel personal, gracias a la Amparo que siempre se ha preocupado, y me ha dado sus mimos y atenciones. Así como agradecer la codirección a la Dra. Medina, por desvelarme sus secretos y compartir conmigo sus "recetas" de Biología Molecular, y personalmente, a la Pili compañera de congresos, cursos y seminarios, reuniones interminables, paño de consuelo y hasta embarazos de nuestros primeros hijos.

Quisiera destacar el papel e importancia que ha tenido en el desarrollo de esta Tesis el resto de personal facultativo que componen la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación: al Jefe de Servicio, el Dr. Edelmiro Réganon, a la Dra. Virtudes Vila, Dra. Juana Vallés, Dra. Teresa Santos y Dra. Esther Zorio, por haberme prestado su colaboración en cuantas ocasiones he necesitado. Especialmente a la Dra. Vicenta Martínez-Sales por su ayuda en el aislamiento y cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana. Al conjunto de técnicos con los que he convivido durante el desarrollo de esta Tesis: M^a Ángeles, Carmen, Dori, Máriam, e Isabel, por su gran ayuda en el trabajo diario. Y cómo no destacar a Úrsula, sin la cual no tendríamos “materia prima” con la que trabajar. Tampoco quisiera olvidar el trabajo de Pilar y Marisa, de Jose, Paqui y Alfonso, o Manoli, Emilia, Rosana y Elvira, sin el cual el Centro no funcionaría.

A mis compañeros: Luis, Elena, Toni, Aitana, Ana, y Belén con los que he compartido tantos buenos ratos, consuelo ante nuestra precariedad, fiestas navideñas y congresos. También a mis compañeras de los años iniciales Reme, Cristina y Marta. A Esther, por sus conversaciones durante las comidas y su apoyo. Y especialmente a Rakel, por ser amiga y compañera, por escucharme, animarme y aconsejarme, porque acompañarme en los mejores momentos de mi vida es fácil, lo difícil es haberlo conseguido en los no tan buenos.

Agradecer al Dr. John H. Griffin la oportunidad de haberme formado en su laboratorio del “Scripps Research Institute” en La Jolla (San Diego), y haberme mostrado otra forma de trabajar. Al Dr. Hiroshi Deguchi, sin cuya ayuda mi estancia allí habría sido un fracaso, y que junto a Natalie, Katia, Xia y la Dra. Hebb, tanta amabilidad mostraron. En esta etapa, gracias también a Julia, por haber sido “mi compañera de andaduras”, por ser tan especial.

A “mis amigas”, por estar siempre ahí, por esas largas conversaciones telefónicas y esos momentos vividos, y que tanto han ayudado a compensar. Especialmente a Gema, por todo lo que me ha enseñado.

A mi familia, porque no podía haber escogido mejor tema para mi tesis que nos pudiera definir. Nosotros somos como la coagulación, que ante cualquier herida allí acudimos, para hacer “tapón”, gracias tías. A Katia, por su talento, y cómo no, a mi hermano y a Amparo, dos personas tan importantes, y que tanto me han apoyado y animado a mi continuidad en la ciencia, aunque no la entendieran demasiado.

Tampoco podían faltar mis abuelas, ese ejemplo de superación en tiempos de tantas carencias.

Y por último, y dejando lo mejor para el final, a la pequeña cosita capaz de hacerme olvidar mi trabajo y que llena mi vida desde hace ya 20 meses: a mi hijo Hugo, así cuando crezcas entenderás el por qué del tiempo sin mí. Y a tí Fermín, gracias por comprenderme y apoyarme desde el principio, por soportar mis fines de semana estudiando desde la universidad, mis ausencias, mis nervios, las horas invertidas en esta tesis,.....gracias por quererme.

La verdad, es difícil agradecer en un par de páginas a todas las personas que con su granito de arena me han ayudado a conseguir esta gran montaña, pero sinceramente, a todos,**GRACIAS**.

*“ De nada sirve comprender el universo
entero cuando se está solo”.
(Paulo Coelho)*

Esta tesis ha sido financiada por la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia, la Fundación Mutua Madrileña Automovilista, la Fundación Ramón Areces, el Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigación Sanitaria PI050844 y RECTIS 06/0014/0004), la Generalitat Valenciana-Agencia Valenciana de Ciencia y Tecnología (Grupos 03/010), y la Fundación para la Investigación del Hospital Universitario la Fe.

Además, cabe destacar que ha sido realizada dentro del entorno de la Red de Investigación Cardiovascular (RECAVA) (ISCiii. Programa RECTIS RD 06 / 0014 / 0004).

ABREVIATURAS

α1-AT	Alfa-1-antitripsina
APC	Proteína C activada
AT	Antitrombina
BMI	Índice de masa corporal
BSA	Albúmina de suero bovino
C4b-BP	Proteína de unión al componente del sistema del complemento C4b
cDNA	DNA complementario
CS	Condroín sulfato
ddNTP	2', 3'-Didesoxinucleótido trifosfato
DE	Desviación estándar
dH₂O	Agua destilada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAasa	Libre de DNA
dNTP	2'-Desoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Enzimoimmunoensayo
ELSD	Sistema de detección por evaporación y dispersión de la luz
EPCR	Receptor endotelial de la proteína C
ERK	Proteínas quinasas reguladoras de la señal extracelular
F1+2	Fragmento 1+2
FIIa	Trombina o Factor II activado
gDNA	DNA genómico
Gla	γ -Carboxiglutamil
GlcCer	Glucosilceramida
Glu	Glutamil
GSLs	Glicolípidos o glucoesfingolípidos
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HUVEC	Célula endotelial de vena umbilical humana
I-CAM	Molécula de adhesión intercelular
IL	Interleukina
kb	Kilobase

kd	Kilodalton
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCP-1	Proteína 1 quimiotáctica de monocitos
MGB	Sondas para ligandos de unión al surco menor
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
OPD	O-Fenilendiamina
OR	Odds ratio
PAI	Inhibidor del activador del plasminógeno
PAR	Receptor del activador de proteasas
pb	Pares de bases
PC	Proteína C
PCI	Inhibidor de la proteína C activada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PECAM-1	Molécula de adhesión a plaqueta-célula endotelial 1
PS	Proteína S
PT	Protrombina o Factor II
PTact	Actividad funcional de la protrombina
PTag	PT antigénica
RFLP	Polimorfismo en la longitud del fragmento de
SIP	Esfingosina-1-fosfato
SBF	Suero fetal bovino
sEPCR	Forma soluble del receptor endotelial de la proteína C
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
Sph	Esfingosina
SSCP	Polimorfismo conformacional de la cadena sencilla
sTM	Forma soluble de trombomodulina
TAFI	Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina
TBE	Tampón Tris/ Ácido bórico/ EDTA
TBS	Tampón Tris-(hidroximetil)-aminometano
TE	Tampón Tris/ EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
TF	Factor tisular
TM	Trombomodulina
Tm	Temperatura de <i>melting</i> o fusión
TMB	Peroxidasa perborato-3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
tPA	Activador tisular del plasminógeno

Tween	Polioxietileno sorbitan monolaurato
UGCG	UDP-glucosa ceramida glucosiltransferasa
uPA	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
V-CAM	Molécula de adhesión de la célula vascular
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VTE	Tromboembolismo venoso

ÍNDICE

1. - INTRODUCCIÓN	1
2. - OBJETIVOS	43
3. - MATERIAL Y MÉTODOS	47
4. - RESULTADOS	103
5. - DISCUSIÓN	161
6. - CONCLUSIONES	177
7. - BIBLIOGRAFÍA	181
8. - ANEXO	223

1.1. - <u>SISTEMA HEMOSTÁTICO</u>	3
1.1.1. <u>LA VÍA DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C: UN MECANISMO NATURAL DE ANTI-COAGULACIÓN</u>	8
1.1.1.1. EL RECEPTOR ENDOTELIAL DE LA PROTEÍNA C (EPCR)	10
1.1.1.1.1. Estructura del gen que codifica para el EPCR	12
1.1.1.1.2. Mutaciones descritas en el gen del EPCR	12
1.1.1.2. EL RECEPTOR ENDOTELIAL DE LA TROMBINA: LA TROMBOMODULINA	13
1.1.1.2.1. Estructura del gen que codifica para la trombomodulina	16
1.1.1.2.2. Mutaciones descritas en el gen de la trombomodulina	16
1.1.1.3. COMPONENTES DE LA MEMBRANA CELULAR: GLICOLÍPIDOS.	19
1.1.1.3.1. El glicolípido neutro glucosilceramida y la coagulación	22
1.1.1.3.2. Estructura del gen que codifica para la glucosilceramida sintasa	23
1.1.1.3.3. Mutaciones descritas en el gen de la glucosilceramida sintasa	25
1.2. - <u>OTRAS FUNCIONES DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C</u>	26
1.2.1. <u>ACCIONES ANTIINFLAMATORIAS</u>	26
1.2.2. <u>PROLIFERACIÓN CELULAR</u>	29
1.2.3. <u>INMUNIDAD</u>	29
1.2.4. <u>ACCIONES CITOPROTECTORAS</u>	30
1.3. - <u>SISTEMA CARDIOVASCULAR: INFARTO DE MIOCARDIO</u>	32
1.3.1. <u>ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR: DESCRIPCIÓN Y FACTORES DE RIESGO</u>	32
1.3.2. <u>ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD</u>	34
1.3.3. <u>ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR, INFLAMACIÓN Y COAGULACIÓN. IMPLICACIÓN DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C EN LA ENFERMEDAD CARDÍACA</u>	36
1.4. - <u>ENFERMEDAD DE BEHÇET</u>	38
1.4.1. <u>DESCRIPCIÓN</u>	38
1.4.2. <u>COAGULACIÓN, INFLAMACIÓN Y ENFERMEDAD DE BEHÇET</u>	39
1.4.3. <u>IMPLICACIÓN DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C EN LA ENFERMEDAD DE BEHÇET</u>	40

2. – HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

2.1. - <u>HIPÓTESIS DE TRABAJO</u>	45
2.2. - <u>OBJETIVOS</u>	46

3. – MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. - <u>GRUPOS CLÍNICOS</u>	49
3.1.1. <u>TROMBOSIS VENOSA</u>	49
3.1.1.1. ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS EN EL GEN DEL EPCR SOBRE EL RIESGO DE VTE, EN SUJETOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN 20210A DEL GEN DE LA PROTROMBINA	50
3.1.1.2. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO C1418T DEL GEN DE LA TROMBOMODULINA, LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE TROMBOMODULINA SOLUBLE Y LOS DE PROTEÍNA C ACTIVADA CON EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO	51
3.1.1.2.1. Análisis funcional del polimorfismo C1418T del gen de la trombomodulina: aislamiento, cultivo y genotipado de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs)	52
3.1.1.3. IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA GLUCOSILCERAMIDA SINTASA (UGCG), Y SU ASOCIACIÓN CON LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GlcCer, PROTEÍNA C ACTIVADA Y RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO	53
3.1.2. <u>TROMBOSIS ARTERIAL</u>	54
3.1.2.1. ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS HAPLOTIPOS A1 Y A3 DEL GEN DEL EPCR Y DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE PROTEÍNA C ACTIVADA Y TROMBOMODULINA SOLUBLE, SOBRE EL RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO PRECOZ.	55
3.1.3. <u>ENFERMEDAD DE BEHÇET</u>	56
3.1.3.1. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C EN LA ENFERMEDAD DE BEHÇET Y SU CORRELACIÓN CON EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO	57
3.2. - <u>MUESTRAS BIOLÓGICAS</u>	57
3.2.1. <u>MUESTRAS PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA</u>	58
3.2.2. <u>MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS</u>	58
3.3. - <u>DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA COAGULACIÓN Y LÍPIDOS RELACIONADOS: técnicas inmunológicas</u>	58
3.3.1. <u>DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE APC CIRCULANTE</u>	58

3.3.2.	<u>DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES ANTIGÉNICOS DE PC</u>	59
3.3.3.	<u>DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EPCR SOLUBLE</u>	60
3.3.4.	<u>DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TROMBOMODULINA</u>	60
3.3.5.	<u>DETERMINACIÓN DEL NIVEL ANTIGÉNICO DE PROTROMBINA</u>	61
3.3.6.	<u>DETERMINACIÓN DEL NIVEL FUNCIONAL DE PROTROMBINA</u>	62
3.3.7.	<u>DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DEL FRAGMENTO 1+2 DE PROTROMBINA</u>	62
3.3.8.	<u>DETERMINACIÓN DE OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS</u>	62
3.3.9.	<u>DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUCOSILCERAMIDA</u>	63
3.4. -	<u>TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</u>	73
3.4.1.	<u>EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO</u>	73
3.4.2.	<u>REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA</u>	73
3.4.2.1.	Amplificación del exón 4 del gen del EPCR	76
3.4.2.2.	Amplificación del fragmento del gen de la TM que incluye las regiones EGF y Ser/Thr de la trombomodulina	77
3.4.2.3.	Amplificación de los 9 exones que componen el gen de la glucosilceramida sintasa (UGCG)	79
3.4.2.4.	Comprobación de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa	82
3.4.3.	<u>PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN</u>	84
3.4.4.	<u>GENOTIPADO DE LAS MUESTRAS</u>	84
3.4.4.1.	SECUENCIACIÓN DIRECTA	85
3.4.4.2.	ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS MEDIANTE LA CONFORMACIÓN DE CADENAS SENCILLAS	86
3.4.4.3.	ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS POR LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN	88
3.4.4.4.	ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS MEDIANTE ENSAYO TaqMan	91
3.4.4.5.	ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS MEDIANTE MINI-SECUENCIACIÓN	97
3.4.4.5.1.	PCR-multiplex	98
3.4.4.5.2.	Purificación de los productos de PCR-multiplex	99
3.4.4.5.3.	Mini-secuenciación	100

4. - RESULTADOS

<u>4.1. ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS EN EL GEN DEL EPCR AL RIESGO DE VTE EN SUJETOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN 20210A EN EL GEN DE LA PROTROMBINA</u>	105
<u>4.1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS INDIVIDUOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN 20210A EN EL GEN DE LA PROTROMBINA INCLUIDOS EN EL ESTUDIO</u>	105
<u>4.1.2. GENOTIPADO DE LAS MUESTRAS PARA LOS POLIMORFISMOS 4600A/G Y 4678G/C DEL GEN DEL EPCR</u>	106
<u>4.1.3. ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS EN EL GEN DEL EPCR CON EL RIESGO DE TROMBOSIS</u>	109
<u>4.1.4. NIVELES DE sEPCR Y RIESGO DE TROMBOSIS</u>	111
<u>4.1.5. NIVELES DE PROTROMBINA Y RIESGO DE TROMBOSIS</u>	113
<u>4.1.6. NIVELES DEL FRAGMENTO 1+2 DE PROTROMBINA Y RIESGO DE TROMBOSIS</u>	114
<u>4.1.7. NIVELES DE PROTEÍNA C ACTIVADA Y RIESGO DE TROMBOSIS</u>	115
<u>4.2. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO 1418C/T DEL GEN DE LA TROMBOMODULINA, NIVELES PLASMÁTICOS DE PROTEÍNA C ACTIVADA Y TROMBOMODULINA SOLUBLE SOBRE EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO</u>	117
<u>4.2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON TROMBOSIS Y CONTROLES SANOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO</u>	118
<u>4.2.2. GENOTIPADO DE LAS MUESTRAS PARA EL POLIMORFISMO 1418C/T EN EL GEN DE LA TROMBOMODULINA</u>	118
<u>4.2.3. ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO C1418T DEL GEN DE LA TROMBOMODULINA CON EL RIESGO DE TROMBOSIS</u>	121
<u>4.2.4. NIVELES DE TROMBOMODULINA SOLUBLE, PROTEÍNA C ACTIVADA Y RIESGO DE TROMBOSIS</u>	122
<u>4.2.5. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DEL POLIMORFISMO 1418C/T EN EL GEN DE LA TROMBOMODULINA EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE VENA UMBILICAL HUMANA (HUVECs)</u>	124

<u>4.3. IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA GLUCOSILCERAMIDA SINTASA (UGCG), Y SU ASOCIACIÓN CON LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GlcCer, APC Y EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO</u>	126
<u>4.3.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES Y CONTROLES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO</u>	126
<u>4.3.2. NIVELES DE GlcCer Y APC, Y RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO</u>	127
<u>4.3.3. IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA GLUCOSILCERAMIDA SINTASA (UGCG)</u>	129
<u>4.3.4. ASOCIACIÓN DE LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS EN EL GEN DE LA UGCG Y LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GlcCer CON EL RIESGO DE TROMBOSIS</u>	137
<u>4.4. ASOCIACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS A1 Y A3 DEL GEN DEL EPCR CON EL RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO PRECOZ</u>	146
<u>4.4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON INFARTO DE MIOCARDIO PRECOZ Y CONTROLES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO</u>	147
<u>4.4.2. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS 4600A/G Y 4678G/C DEL GEN DEL EPCR Y RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO PRECOZ</u>	148
<u>4.4.3. NIVELES DE PROTEÍNA C ACTIVADA (APC) Y sEPCR Y RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO PRECOZ</u>	151
<u>4.5. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C EN LA ENFERMEDAD DE BEHÇET Y SU CORRELACIÓN CON EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO</u>	154
<u>4.5.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES Y CONTROLES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO</u>	154
<u>4.5.2. PARÁMETROS DE LA COAGULACIÓN EN PACIENTES Y CONTROLES</u>	155
<u>4.5.3. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS 4600A/G Y 4678G/C DEL GEN DEL EPCR Y RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO</u>	156

5. - DISCUSIÓN

<u>5.1. ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS EN EL GEN DEL EPCR AL RIESGO DE VTE EN SUJETOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN 20210A EN EL GEN DE LA PROTROMBINA</u>	163
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

5.2.	<u>ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO C1418T DEL GEN DE LA TROMBOMODULINA, NIVELES PLASMÁTICOS DE PROTEÍNA C ACTIVADA Y TROMBOMODULINA SOLUBLE SOBRE EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO</u>	166
5.3.	<u>IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA GLUCOSILCERAMIDA SINTASA (UGCG), Y SU ASOCIACIÓN CON LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GlcCer, PROTEÍNA C ACTIVADA Y EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO</u>	169
5.4.	<u>ASOCIACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS A1 Y A3 DEL GEN DEL EPCR CON EL RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO PRECOZ</u>	171
5.5.	<u>EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C EN LA ENFERMEDAD DE BEHÇET Y SU CORRELACIÓN CON EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO</u>	174
6. - CONCLUSIONES		
6.	<u>CONCLUSIONES</u>	177
7. - BIBLIOGRAFÍA		
7.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	181
8. - ANEXO		
8.	<u>ANEXO</u>	223

1. – INTRODUCCIÓN

- 0 -

*“Los grandes conocimientos engendran las grandes dudas.
No se puede desatar un nudo sin saber cómo está hecho.
Nunca se alcanza la verdad total,
ni nunca se está totalmente alejado de ella”
(Aristóteles)*

1.1. - SISTEMA HEMOSTÁTICO

La HEMOSTASIA es el conjunto de procesos que controlan la fluidez de la sangre y la integridad del sistema vascular. Comprende un elevado número de reacciones e interacciones entre los componentes sanguíneos y la pared de los vasos (Maruyama I *et al*, 1998). El SISTEMA HEMOSTÁTICO es el encargado de mantener en equilibrio el sistema vascular, detectando las roturas, deteniendo las pérdidas de sangre que se pudieran producir, a la vez que mantiene la permeabilidad de los vasos y repara el daño tisular y vascular que se haya generado. Está formado por cuatro procesos fundamentales: la COAGULACIÓN y la ANTICOAGULACIÓN, que controlan la formación del coágulo, y la FIBRINOLISIS y la ANTIFIBRINOLISIS que controlan la eliminación de este coágulo. Todos estos procesos convergen en la *trombina*, que se encarga de convertir el fibrinógeno en fibrina, la cual polimeriza para formar el coágulo, de activar al factor XIII para estabilizar a la fibrina, haciendo el coágulo más resistente a su disolución, y de activar las plaquetas para acelerar la coagulación. La trombina también es capaz de activar a la célula endotelial, promoviendo la liberación de sustancias que van a intervenir en los procesos de fibrinólisis y anticoagulación.

Cuando un vaso sanguíneo se rompe o daña, se ponen en marcha diferentes mecanismos hemostáticos que, a efectos didácticos, podemos agrupar en cuatro fases:

1. Contracción de la pared del vaso.
2. Adhesión y posterior agregación de las plaquetas en la zona del vaso lesionado.
3. Formación y consolidación del coágulo de fibrina o coagulación.
4. Eliminación del coágulo o fibrinólisis.

Las dos primeras fases en conjunto forman la HEMOSTASIA PRIMARIA, en la que se genera el primer tapón hemostático y en la que interviene únicamente la pared del vaso sanguíneo, las plaquetas y algunas proteínas plasmáticas. La pared del vaso sanguíneo contiene tres capas bien diferenciadas: la íntima, media y adventicia, siendo la íntima o más interna la que juega un papel fundamental en la hemostasia primaria, ya que permite que las células endoteliales queden en contacto con la sangre circulante, sintetizando y liberando sustancias con actividades pro- y antitrombóticas.

Las dos últimas fases forman la HEMOSTASIA SECUNDARIA, en la que el objetivo final es la formación del coágulo de fibrina y su posterior disolución, una vez controlado el daño vascular.

El SISTEMA DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA (Esmon CT, 2000a; Mann KG, 1999; Davie EW *et al*, 1995) lo forman diversas proteínas, que circulan en forma de proenzimas y que se van activando unas a otras secuencialmente en presencia de un cofactor no enzimático, formando una cascada de reacciones enzimáticas sobre la pared del vaso o la superficie fosfolipídica de plaquetas, cuya finalidad será transformar el *fibrinógeno* en *fibrina*, gracias a la acción de la *trombina*, la cual polimeriza dando el coágulo de fibrina, que contribuye al taponamiento de la lesión vascular.

La coagulación sanguínea puede iniciarse mediante dos vías. La *vía de activación de la coagulación intrínseca* (Figura 1.1), donde la reacción inicial es la activación del factor (F) XII de la coagulación tras exponerse a superficies cargadas negativamente. Este FXIIa activa a su vez a la precalicreína plasmática. La calicreína formada es un potente activador del FXII, generándose así un proceso de retroalimentación positiva gracias al cual se forman cantidades considerables de FXIIa, el cual activa al FXI en presencia del cofactor quinínogeno de alto peso molecular (HMWK). A su vez, el FXIa activa al FIX. El FIXa junto a su cofactor, el FVIIIa, activa al FX, que junto a su cofactor el FVa activará al FII o protrombina (PT) a trombina (FIIa). Estas dos últimas reacciones requieren de la presencia de iones Ca^{2+} y fosfolípidos (FL). Finalmente, la trombina transforma al fibrinógeno en fibrina, la cual polimeriza para dar una malla tridimensional con diferentes tipos de células atrapadas, tales como eritrocitos, monocitos y plaquetas. Este coágulo es estabilizado por el FXIII, haciéndolo más resistente a su disolución.

La activación fisiológica de la coagulación sanguínea transcurre principalmente por la *vía extrínseca* (Figura 1.1.). En ella, el factor tisular (TF)

juega un papel fundamental como iniciador del proceso (Morrissey JH *et al*, 2001). El TF es una proteína de membrana que está presente en la superficie de

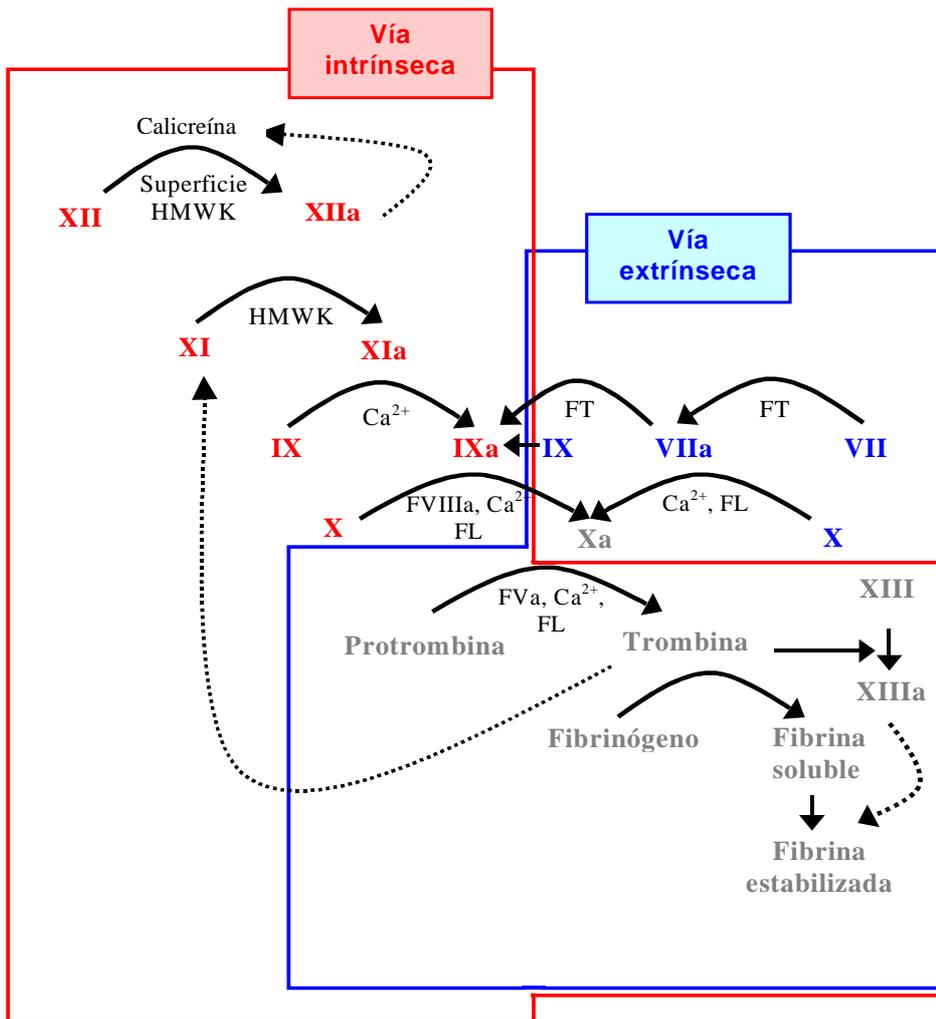


FIGURA 1.1. Esquema de las vías de activación de la coagulación sanguínea.

determinados tipos celulares tales como células endoteliales, plaquetas y monocitos, pero no expuesto a la sangre circulante. Así, tras la exposición del TF al torrente circulatorio después de la rotura de un vaso, o tras la activación plaquetaria o de monocitos, se activa el FVII, y juntos activan al FX de la coagulación. El resto de reacciones son comunes para ambas vías. Existen otros dos importantes mecanismos de retroalimentación positiva. Uno es la activación del FIX por el complejo FVIIa-TF. El otro, la activación del FXI por la trombina. Ambos permiten una rápida generación de FXa.

Para evitar que el coágulo se propague y extienda de un modo incontrolado, existen toda una serie de mecanismos de control. Por una parte, el requerimiento de una superficie fosfolipídica cargada negativamente para que tengan lugar las reacciones de la coagulación, ya limita considerablemente su propagación más allá del lugar del daño vascular, al restringir las reacciones enzimáticas en dicho lugar. Otro sistema de control es el **sistema de la anticoagulación sanguínea**, encargado de regular la formación y/o actividad de los enzimas de la coagulación, con la finalidad última de limitar la formación de trombina. Está formado por un conjunto de inhibidores de proteasas, la *antitrombina (AT)*, el *cofactor II de la heparina*, la *α_1 -antitripsina (α_1 -AT)*, el *C1-Inhibidor*, el *inhibidor de la proteína C activada (PCI)*, y el sistema de la *proteína C (PC)*.

Otro mecanismo de control es el sistema de la **fibrinólisis**, el cual se encarga de la disolución del coágulo de fibrina una vez se ha reparado el daño vascular. Puesto que la fibrinólisis se activa casi en el mismo momento que se inicia la coagulación, también participa en la limitación del crecimiento del coágulo. La *plasmina* es el enzima encargado de la degradación proteolítica de la malla de fibrina por múltiples sitios, generando pequeños fragmentos denominados productos de degradación de fibrina, solubles en sangre (Collen D *et al*, 1999). La *plasmina* circula en sangre en forma de proenzima inactiva o plasminógeno, que será activado mediante ruptura proteolítica por enzimas activadoras del plasminógeno, el de tipo tisular (tPA) y la uroquinasa (uPA), además de la calicreína plasmática y la estreptoquinasa. La **antifibrinólisis** es el sistema que regula que el coágulo de fibrina no sea lisado antes de lo debido. Actúa vía los inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAI), siendo el tipo 1 (PAI-1) el más importante y encargado de inhibir al tPA y uPA. Existen otros PAIs que son menos efectivos: el PAI-2, presente en sangre de mujeres embarazadas, y el PAI-3, idéntico al PCI. También destacamos el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI). Otro inhibidor de la fibrinólisis es la glicoproteína rica en histidina, que actúa impidiendo la unión del plasminógeno a la fibrina, y por tanto inhibe la generación de plasmina, y la α_2 -antiplasmina, que inhibe directamente a la plasmina.

En nuestro trabajo nos centraremos en los desórdenes hemostáticos asociados con la TROMBOFILIA, que define la tendencia trombótica o estado en el cual hay una mayor probabilidad de sufrir un evento trombótico (Carrell RW *et al*, 2004; Mannucci PM & Tripodi A, 1996; Lane DA *et al*, 1996a & 1996b). Actualmente se considera a la trombosis como una enfermedad multifactorial, en la

que inciden una suma de factores endógenos que predisponen al suceso trombótico bajo la influencia de una exposición a factores exógenos (Simmonds RE & Lane DA, 2001a; Martinelli I, 2001; Franco RF *et al*, 2001; Spek CA *et al*, 2000; Zöller B *et al*, 1999; Simioni P *et al*, 1999; Rosendaal FR *et al*, 1999; Ferre-Antunes C *et al*, 1998; Seligsohn U *et al*, 1997; Rao AK *et al*, 1997). Dicha predisposición engloba defectos genéticos o adquiridos que provocan en el individuo una disminución a la resistencia hemostática para enfrentarse a las alteraciones normales producto de la edad, dislipemias, diabetes, el embarazo, el puerperio, inmobilizaciones, intervenciones quirúrgicas, uso de anticonceptivos orales, terapia hormonal sustitutiva, etc (Estellés A *et al*, 1984 & 1998 & 1999 & 2001; Santamaria A *et al*, 2001; Falcó C *et al*, 2001; Vayá A *et al*, 2002b; Solá E *et al*, 2008b & 2009). Además, está claramente establecida la asociación entre el déficit de diversas proteínas que intervienen en el mantenimiento de la hemostasia normal de un individuo y un mayor riesgo trombótico. Así, las deficiencias de AT, PC o proteína S (PS), así como las disfibrinogenemias y displasminogenemias, e hiperhomocisteinemias se asocian claramente con un mayor riesgo de tromboembolismo venoso (VTE). Pero estas deficiencias por sí solas no consiguen explicar más de un 10-15% de los casos de trombosis. Posteriormente se describieron dos defectos genéticos, la mutación FV Leiden y la mutación 20210A del gen de la PT, que en conjunto pueden explicar hasta un 30% de las trombosis venosas. Sin embargo, en conjunto todas estas anomalías solo explican hasta un 50% de las trombosis, de forma que es posible la existencia de mutaciones o alteraciones en alguno de los componentes del sistema hemostático todavía desconocidas, y que sumadas a otras alteraciones o por sí solas, nos permitan explicar el evento trombótico.

La mutación FV Leiden (Bertina R *et al*, 1994; Lane DA *et al*, 1996a & 1996b; De Stefano *et al*, 2002), consiste en una mutación puntual en el gen del FV de la coagulación sanguínea, en el que se produce el cambio G/A en posición 1691. La mutación produce el cambio de aminoácido de Arg a Gln en posición 506. La inactivación del FVa ocurre mediante el corte proteolítico de los enlaces en posición Arg306, Arg506 y Arg679, controlando así la velocidad y extensión de la coagulación, siendo el corte por Arg506 el que acelera el corte de las otras dos argininas. Cuando la Arg506 está sustituida por ácido glutámico, la APC no puede cortar este enlace y la velocidad de rotura de las otras dos argininas se reduce, de forma que la inactivación del FVa es mucho más lenta, y la coagulación no puede regularse en este punto, existiendo por tanto, una mayor tendencia a la trombosis. Está presente en un 1-5% de la población general, aunque la prevalencia de la

mutación FV Leiden depende de la población y área geográfica de estudio, siendo del 3-6% en la población caucásica, y prácticamente inexistente en las poblaciones de origen asiático (Rosendaal FR *et al*, 1998). La mutación FV Leiden está presente en un 15-50% de los pacientes con VTE, aumenta el riesgo de recurrencia trombótica (De Stefano V *et al*, 2001; Marchiori A *et al*, 2007), y presenta una gran variabilidad fenotípica, debido a la interacción con otros factores de riesgo trombótico (Vanderbroucke JP *et al*, 1994; Koeleman BP *et al*, 1994; Zöller B *et al*, 1995; Tirado I *et al*, 2001; Emmerich J *et al*, 2001; Van Rooden CJ *et al*, 2004; Medina P *et al*, 2005). La segunda mutación más frecuente es la mutación 20210A en el gen de la PT. Fue descrita por Poort y colaboradores en 1996. Produce el cambio G/A en posición 20210, en el nucleótido 3'-terminal de la región 3' no traducida del mRNA. En presencia del alelo 20210A se crea un sitio de poliadenilación más eficiente, dando lugar bien a un incremento de mRNA (Ceelie H *et al*, 2004) o bien a una mayor eficiencia de traducción para este mRNA (Pollak ES *et al*, 2002) y, en definitiva, a una mayor síntesis proteica (Gehring NH *et al*, 2001; Carter AN *et al*, 2002). Así, el alelo 20210A está asociado con niveles plasmáticos de PT elevados, los cuales inducen resistencia a la APC, aumentando el riesgo de trombosis venosa y arterial (Rosendaal FR *et al*, 1997; Doggen CJ *et al*, 1998a), y también está asociado con una mayor glicosilación de la PT, lo que le confiere una mayor estabilidad (Gelfi C *et al*, 2004). La prevalencia de la mutación 20210A depende de la población y área geográfica de estudio, siendo del 3% en la población caucásica del sur de Europa, del 1,7% en la población caucásica del norte de Europa, y prácticamente inexistente en las poblaciones de origen asiático y africano (Rosendaal FR *et al*, 1998). El riesgo de recurrencia de VTE espontánea en los individuos portadores de esta mutación está ligeramente aumentado o es similar al riesgo de los pacientes sin mutación (De Stefano V *et al*, 2001; Marchiori A *et al*, 2007).

1.1.1. LA VÍA DE LA PROTEÍNA C: UN MECANISMO NATURAL DE ANTICOAGULACIÓN

La vía de la proteína C (PC) es un mecanismo natural de anticoagulación que inhibe la formación de trombina mediante la inactivación proteolítica de los factores de la coagulación. FV y FVIII activados (FVa y FVIIIa respectivamente) (Esmon CT, 1987a & 1992 & 2003b; Esmon CT *et al*, 1987b). Así, tras producirse el daño vascular, se activa la coagulación con la consiguiente formación de trombina. La PC es un zimógeno inactivo vitamina K-dependiente, precursora de la serinproteasa proteína C activada (APC). Su activación tiene lugar por acción de la

trombina. Sin embargo, esta activación es muy lenta en solución. Así, para la activación de la PC *in vivo*, la trombina debe unirse a un receptor específico situado en la superficie de la célula endotelial, la trombomodulina (TM), y este complejo activa eficientemente a la PC sobre la superficie de la célula endotelial (Figura 1.1.1). Además, la unión de la PC a otro receptor endotelial, el receptor endotelial de la PC (EPCR), acelera aún más la activación de la PC. Una vez generada, la APC se disocia del EPCR y se une a su cofactor, la proteína S (PS), una segunda proteína vitamina K-dependiente localizada en la circulación y la superficie de plaquetas. El complejo APC-PS inhibe, por degradación proteolítica, a los cofactores de la coagulación FVa y FVIIIa, reduciendo drásticamente la formación de trombina. La PS circula en plasma en forma libre o acompañada con

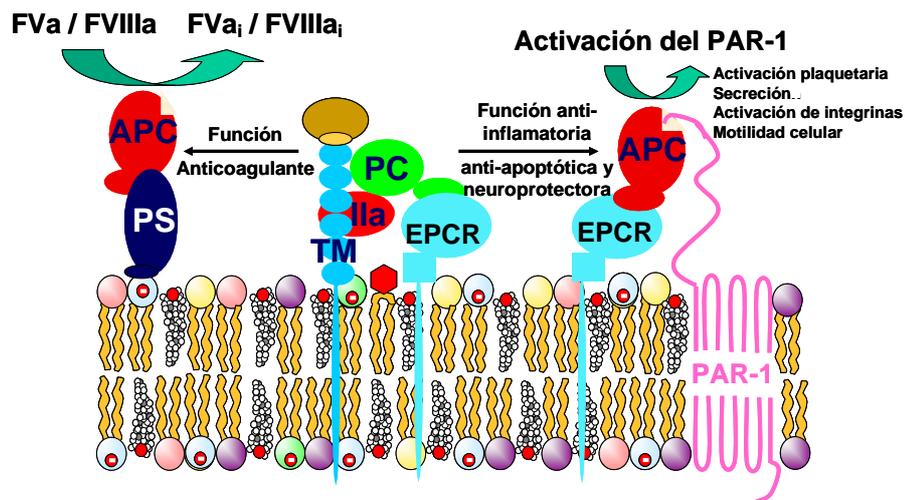


FIGURA 1.1.1. Esquema del mecanismo de activación de la proteína C.

un componente regulador del sistema del complemento (C4b-BP). Solo la forma libre es capaz de actuar como cofactor de la función anticoagulante de la APC. A su vez, la actividad anticoagulante de la APC está regulada por varios inhibidores, entre los que destacan la α_1 -AT, el inhibidor de la PC (PCI), y la α_2 -macroglobulina. Por otra parte, la trombina unida a la TM, es fácilmente inactivada por la AT, quedando el complejo trombina:AT rápidamente disociado de la TM.

Una vez activada, la APC puede quedar unida a su receptor, el EPCR, y expresar de esta manera sus funciones citoprotectoras. Así, el complejo APC-EPCR es capaz de activar a otro receptor endotelial, el receptor activado por proteasas tipo 1 (PAR-1), iniciando de esta manera una serie de señalizaciones intracelulares que desembocan en acciones antiinflamatorias, antiapoptóticas y

neuroprotectoras (España F *et al*, 2005; Mosnier LO *et al*, 2007b; Jackson C *et al*, 2008).

1.1.1.1. EL RECEPTOR ENDOTELIAL DE LA PROTEÍNA C

El receptor endotelial de la proteína C (EPCR) (Esmon CT *et al*, 1999b; Esmon CT, 2000b) es una proteína integral de membrana de tipo I, que consta de 238 aminoácidos. Tras la eliminación de 17 residuos, se origina la proteína madura, formada por 221 aminoácidos. La proteína contiene una secuencia señal de 15 aminoácidos en el extremo N-terminal, un dominio extracelular con 4 sitios potenciales de N-glicosilación y 3 residuos Cisteína, una región transmembrana de 25 aminoácidos en el extremo C-terminal, y una cola citoplasmática corta compuesta únicamente por 3 aminoácidos, lo que prácticamente impide su capacidad de señalización. Estructuralmente, es una proteína homóloga de la superfamilia de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I/CD1, lo que sugiere un posible papel modulador de la inflamación y la inmunidad.

Se localiza principalmente en la membrana de la célula endotelial de grandes vasos y, además de la forma unida a la membrana, el EPCR es escindido del endotelio mediante la acción de metaloproteasas, activadas por mediadores inflamatorios (IL-1 β), trombina, peróxido de hidrógeno o acetato de miristato forbol. Esta forma soluble de EPCR (sEPCR) carece del dominio transmembrana y la corta cola citoplasmática, está presente en el plasma, y es capaz de unir PC y APC con la misma afinidad. La unión de la PC al sEPCR bloquea su activación al bloquear la interacción fosfolipídica y del sitio activo necesario para ello, mientras que la unión de la APC al sEPCR inhibe su función anticoagulante. Además, el sEPCR se une a neutrófilos, en un proceso donde están implicados la proteinasa 3 y el complejo CD11b/CD18 o Mac-1, sugiriendo la existencia de un vínculo entre la vía de activación de la PC y las funciones de los neutrófilos (Kurosawa S *et al*, 2000), que el sEPCR limitaría. Los niveles plasmáticos de sEPCR en la población general presentan una distribución bimodal (Stearns-Kurosawa DJ, 2003). Así, entre el 15-20% de la población tiene unos valores plasmáticos de sEPCR que varían entre 200 y 800 ng/ml, y el resto tienen valores por debajo de los 180 ng/ml. Determinadas patologías o situaciones patológicas aumentan los niveles de sEPCR, tales como lupus eritomatoso o sepsis (Kurosawa S, 1998).

Qu y colaboradores (2007) demostraron que la metaloproteasa ADAM17, inicialmente identificada como TACE (TNF α *converting enzyme*), regulaba el corte

proteolítico del EPCR anclado a la membrana, localizando además la región para este corte entre los aminoácidos 192 y 200. Además, ADAM17 promueve el corte proteolítico de la membrana y liberación a la circulación de múltiples proteínas, destacando moléculas pro-inflamatorias y de adhesión (TNF α , V-CAM-1, L-Selectina, la proteína precursora β -amiloide, el receptor tipo II de IL-1, etc) (Qu D *et al*, 2007; Peiretti F *et al*, 2009). Recientemente, se ha demostrado que existe otro mecanismo implicado en la generación de sEPCR, mediado por la generación de sitios de corte y empalme de mRNA o *splicing* alternativos, y responsable de generar una isoforma truncada de sEPCR (Saposnik B *et al*, 2008a; Saposnik B *et al*, 2008b; Molina E *et al*, 2008).

La expresión de EPCR es inhibida por lipopolisacáridos, IL-1 β , TNF α y trombina. Y por otra parte, el EPCR es capaz de traslocarse al núcleo, ejerciendo acciones reguladoras de la respuesta inflamatoria, ya que regula la expresión génica de las proteínas implicadas. En esta translocación, el EPCR puede llevar unido APC (Esmon CT, 2003a & 2008).

Además de la función anticoagulante dependiente de PC, el EPCR tiene una acción anticoagulante independiente. El EPCR puede unirse al FVII/FVIIa, inhibiendo así la activación del FX (Preston RJ *et al*, 2006; Ghosh S *et al*, 2007; López-Sagaseta J *et al*, 2007). Por otra parte, la unión del FVIIa al EPCR produce un cambio conformacional en el factor de la coagulación que facilita su endocitosis y eliminación de la circulación (Ghosh S *et al*, 2007). Tanto la PC como el FVIIa tienen similar afinidad de unión por el EPCR, y ambos se unen por la misma región del dominio Gla, de manera que compiten por su unión al EPCR (Preston RJ *et al*, 2006; Ghosh S *et al*, 2007; López-Sagaseta J *et al*, 2007). Sin embargo, la concentración fisiológica de la PC en plasma es de 70 nM mientras que la del FVII es de 10 nM, por lo que la generación de APC se ve mínimamente afectada por la presencia del FVII. Aunque, en ciertos tratamientos con FVIIa recombinante, las concentraciones farmacológicas de FVIIa alcanzadas podrían inhibir parcialmente la activación de la proteína C dependiente del EPCR y la señalización celular mediada por la APC, aumentando el efecto procoagulante del FVIIa recombinante (Ghosh S *et al*, 2007; López-Sagaseta J *et al*, 2007). Además, Molina y colaboradores, demostraron que la isoforma truncada de sEPCR que habían identificado, también es capaz de unirse al FVIIa, inhibiendo así la activación del FX y contrarestando el efecto proinflamatorio del sEPCR vía unión PC/APC (Molina E *et al*, 2008).

1.1.1.1.1. Estructura del gen que codifica para el EPCR

El gen del EPCR, también conocido como PROCR, está localizado en el cromosoma 20, se expande a lo largo de 8 Kb y está constituido por 4 exones (Fukudome K & Esmon CT, 1994; Esmon CT & Fukudome K, 1995b; Simmonds RE & Lane DA, 1999; Hayashi T *et al*, 1999). El sitio de inicio de la transcripción está situado 79 pb *upstream* del codón de inicio de la traducción (Met) y 84 pb “*downstream*” de una secuencia reguladora de tipo caja TATA. A su vez, existen potenciales dianas de unión de los factores de transcripción AP1, SP1 y AP2 en la región promotora del gen, dos elementos reguladores CAAT (posiciones -436 y -243) y un sitio de reconocimiento para “*enhancer binding protein*” (posición -462). El exón 1 (138 pb; aminoácidos 1 – 24) codifica para la región 5’ no traducida, el péptido señal y 7 aminoácidos adicionales; el intrón I tiene una longitud de 2477 pb y contiene una secuencia repetitiva Alu (nt 1230 – 1590); el exón 2 (252 pb; aminoácidos 24 – 108) codifica para parte de la región extracelular del receptor; el intrón II tiene una longitud de 1217 pb y contiene un elemento repetitivo Alu (nt 3417 – 3747); el exón 3 (279 pb; aminoácidos 108 – 201) codifica para el resto de la región extracelular del EPCR; el intrón III tiene una longitud de 251 pb; y el exón 4 (659 pb; aminoácidos 201 – 238) codifica para 10 residuos adicionales de la región extracelular, el dominio transmembrana, la cola citoplasmática corta y la mayor parte de la región 3’ no traducida. Se han identificado 2 sitios alternativos de poliadenilación en la región 3’ del gen.

1.1.1.1.2. Mutaciones descritas en el gen del EPCR

Se ha descrito la existencia de cuatro haplotipos en el gen del EPCR, con diferentes polimorfismos marcadores de haplotipo para tres de los cuatro haplotipos descritos.

El haplotipo 1 (A1), identificado mediante el alelo mutado para el polimorfismo 4678G/C (rs9574) localizado en la región 3’ no traducible del EPCR, está asociado con elevados niveles de APC circulante y una disminución del riesgo de tromboembolismo venoso (VTE) (Medina P *et al*, 2004 & 2005). El mecanismo por el cual aumenta los niveles de APC y reduce el riesgo trombótico se desconoce, aunque se supone que en presencia del alelo mutado se estabiliza el mRNA, sintetizándose una mayor cantidad de EPCR en la membrana de la célula endotelial, que produce una mayor activación de la PC y mayores niveles de APC circulantes.

El haplotipo 2 (A2) se corresponde con la secuencia original que contiene los alelos más frecuentes.

El haplotipo 3 (A3), identificado mediante el alelo mutado para el polimorfismo 4600A/G (rs867186), está localizado en el exón 4 del EPCR y genera el cambio de aminoácido de Ser a Gly en posición 219. Está asociado con elevados niveles de sEPCR circulante, posiblemente debido a que en presencia del alelo 4600G se produce un cambio conformacional que aumenta la sensibilidad del ADAM17 por el EPCR en la superficie de la célula endotelial, aumentando el corte proteolítico de la proteína (Qu D *et al*, 2007). Puesto que el sEPCR puede unir con la misma afinidad FVII/FVIIa y PC/APC, (Preston RJ *et al*, 2006; Ghosh S *et al*, 2007; López-Sagaseta J *et al*, 2007), se podría pensar que el haplotipo A3, mediante su asociación con elevados niveles de sEPCR, podría estar asociado con un mayor riesgo de VTE. Los resultados de los diferentes estudios son contradictorios. En sujetos franceses, se ha descrito una asociación entre la presencia del haplotipo A3 y un aumento del riesgo de VTE (Saposnik B *et al*, 2004). Sin embargo, otros estudios no han sido capaces de mostrar una asociación entre el haplotipo A3 y el riesgo de VTE, tanto en sujetos españoles (Medina P *et al*, 2004 & 2005), holandeses (Uitte de Willige S *et al*, 2004) o estadounidenses (Pecheniuk NM *et al*, 2008). Además, Ireland y colaboradores (2005) demostraron en un estudio caso-control de pacientes con infarto de miocardio, que los individuos portadores del haplotipo A3 tenían un menor riesgo de infarto de miocardio, excluyendo individuos con diabetes y síndrome metabólico.

El haplotipo 4 (A4), identificado mediante el alelo mutado para el polimorfismo 3811G/A localizado en el intrón 2 del gen del EPCR, está ligeramente asociado a un aumento del riesgo trombótico (Uitte de Willige S *et al*, 2004).

1.1.1.2. EL RECEPTOR ENDOTELIAL DE LA TROMBINA: LA TROMBOMODULINA

La trombomodulina (TM) es el receptor situado en la superficie de la célula endotelial específico de la trombina. Cuando la trombina se une a la TM pierde sus propiedades procoagulantes y se convierte en un potente anticoagulante, al activar eficientemente a la PC. Ello es así porque dicha unión se realiza por el mismo sitio por el que la trombina ejerce sus funciones procoagulante. La TM pertenece al grupo de glicoproteínas de membrana tipo I, y se sintetiza como una proteína de 575 aminoácidos. Tras la eliminación de 18 aminoácidos, se genera la proteína

madura, con una masa molecular de 60,3 kd y compuesta por 557 aminoácidos. Estructuralmente tiene una organización similar a la del receptor de LDL. Está formada por un dominio globular N-terminal tipo lectina (aminoácidos 1 a 154), seguido de una región hidrofóbica (aminoácidos 155 a 222), una región homóloga al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (aminoácidos 223 a 462), compuesta por 6 dominios consecutivos tipo EGF unidos por puentes disulfuro, una región rica en Ser/Thr (aminoácidos 463 a 497) con sitios de unión para modificaciones post-transcripcionales por N- y O-glicosilaciones, y en especial la adición de condroín sulfato (CS), un dominio transmembrana (aminoácidos 498 a 521) y una corta cola citoplasmática (aminoácidos 522 a 557). La proteína es homóloga a un gran número de proteínas con dominios tipo EGF, como el FVII, FIX, FX, FXII, PC, tPA y uPA.

Las funciones específicas para cada uno de estos dominios han sido estudiadas ampliamente. El dominio tipo lectina es homólogo a la estructura de las selectinas envueltas en la adhesión leucocitaria. Está relacionado con funciones relacionadas con la inmunidad, como el tráfico de leucocitos, la activación del complemento (Van de Wouwer M *et al*, 2004b), y la inflamación, ya que regula la adhesión de leucocitos, la ruta de las MAPKs y activación del NF- κ B (DiDonato J *et al*, 1996). Además, es esencial como receptor de la endocitosis para la internalización y degradación de la trombina en la célula endotelial tras la formación del complejo trombina-TM, protegiendo así las paredes de los vasos y reduciendo la tendencia trombótica (Ghosh S *et al*, 2007). También es importante en la regulación del crecimiento celular, en especial de tumores, y de la apoptosis.

La región rica en Ser-Thr parece actuar como región espaciadora, permitiendo la correcta situación de la trombina sobre la membrana para la unión a la TM, facilitando su actividad anticoagulante (Hancock WW *et al*, 1992). Aunque no todas las moléculas de TM están modificadas por el CS, en presencia de CS se aumenta entre 10 y 20 veces la afinidad de la trombina por la TM, efecto de la interacción entre el CS y el dominio *exosite* II de la trombina. Además, la interacción entre CS y trombina, modifica la conformación y afinidad de unión de la trombina, facilitando la unión de AT e inhibidor de la PC (PCI), que inactivan a la trombina, y reducen su vida media en plasma.

La región con los 6 dominios tipo EGF es la mejor caracterizada. Los dominios EGF_{4-6} constituyen el dominio funcional o sitio activo de la TM. La TM se une a la trombina formando un complejo de alta afinidad ($K \approx 0,2$ nM), mediante su dominio de unión aniónica *exosite* I y la región que conforma el *loop*

C del EGF₅, el loop interdominio EGF₅₋₆, y los *loops* B y C del EGF₆ de la TM. Esta unión inhibe además la interacción de la trombina con el fibrinógeno, con las plaquetas, y con el receptor de proteasas activado (PAR)-1 vía la región *exosite* I de la trombina. La PC se une al dominio EGF₄ a través de los residuos Glu357-Tyr358-Gln359 y Glu374-Gly375-Phe376, y en presencia de iones Ca²⁺ (Petersen TE *et al*, 1988; Drickamer K *et al*, 1988). Asimismo, se ha observado que el residuo Met388 situado en el *loop* interdominio entre EGF₄ y EGF₅ es esencial para la activación de la proteína C por el complejo trombina-TM, ya que su oxidación elimina esta activación (Vasta GR *et al*, 1999; Weiler H *et al*, 2003). Los dominios EGF₃₋₆ son también los dominios responsables de la activación del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI) (Crockett-Torabi E *et al*, 1998), una β -procarboxipeptidasa plasmática encargada de eliminar los residuos de lisina carboxi-terminales de la fibrina, haciendo al coágulo de fibrina más resistente a la lisis (Hubbard AK *et al*, 2000; Weiler H *et al*, 2003). Además de intervenir en la activación de la PC mediada por trombina y en la activación del TAFI, los dominios tipo EGF de la TM son capaces de estimular el crecimiento de fibroblastos y células musculares (Nawa K *et al*, 1994), lo que sugiere un posible papel en la cicatrización de heridas, proliferación celular y desarrollo de la aterosclerosis.

La TM se localiza en la membrana del endotelio vascular mayoritariamente, pero también está presente en múltiples tejidos y células de adultos y durante el desarrollo, incluyendo astrocitos, keratinocitos, células mesoteliales, neutrófilos, monocitos y plaquetas, aunque en pequeñas cantidades. En el endotelio vascular, la TM se localiza fundamentalmente a lo largo de la microvasculatura, inhibiendo la actividad procoagulante de la trombina generada en condiciones basales, y asegurando unos niveles de APC adecuados. Además de la molécula anclada a la membrana de la célula endotelial, existe una forma soluble de TM circulante en plasma y orina (sTM), carente del dominio transmembrana y citosólico, como consecuencia del corte proteolítico y liberación de la superficie endotelial. La concentración de esta forma de sTM aumenta en determinados estados y patologías asociadas a disfunción endotelial, enfermedades cardiovasculares, diabetes, daño isquémico, inflamación, hiperhomocisteinemia, fallos renales, daño pulmonar, procesos sépticos, vasculitis, enfermedades del colágeno, malaria, etc. Así, los niveles de sTM se pueden utilizar como marcador de daño endotelial *in vivo*. Se han descrito propiedades protectoras del sistema vascular para estos fragmentos de sTM (Van der Wouwer M *et al*, 2004).

1.1.1.2.1. Estructura del gen que codifica para la trombomodulina

El gen de la TM se localiza en posición 20p11.2, y carece de secuencias intrónicas (Jackman RW *et al*, 1987). En la región promotora proximal y distal se han identificado diferentes elementos reguladores positivos y negativos para la transcripción del gen de la TM, de gran importancia para la expresión del gen. Así, existe un elemento silenciador (posición -941 a -766), una caja CAAT (posición -110 a -105), cuatro posibles sitios de unión para el factor de transcripción Sp1 (posiciones -12 a -123; -140 a -135; -206 a -201; y -269 a -264), una región sensible al choque térmico (posición -77 a -47), una caja PyPu (posición -76 a -56), y una caja TATA (posición -26 a -22). Además, se ha identificado la existencia de un elemento silenciador, un elemento de respuesta al "shear stress" y 4 elementos de respuesta al ácido retinoico. Solamente la caja CAAT, dos sitios de unión para Sp1 (posiciones -206 y -140) y la región -74 a +20 se han demostrado funcionales (Le Flem L *et al*, 1998).

La TM está regulada transcripcionalmente de forma positiva por trombina, factor de crecimiento vascular endotelial, histamina, dibutilil cAMP, ácido retinoico, teofilina, choque térmico y estatinas. Y de forma negativa por las fuerzas hemodinámicas y tensión de deformación en las paredes del vaso, hipoxia, LDL oxidadas, y por el factor de crecimiento β transformado. Además, las citocinas liberadas durante la inflamación TNF α e IL-1 β , inhiben la expresión de TM en las células endoteliales a nivel transcripcional y post-transcripcional (Van de Wouwer M *et al*, 2004b).

1.1.1.2.2. Mutaciones descritas en el gen de la trombomodulina

Mediante el estudio con modelos animales, se demostró la relación entre moléculas disfuncionales o deficientes de TM y un estado protrombótico (Kumada T *et al*, 1988; Gomi K *et al*, 1990; Healy AM *et al*, 1995 & 1998; Christie PD *et al*, 1999; Isermann B *et al*, 2001; Weiler H *et al*, 1998 & 2001). Además, también se ha demostrado la asociación entre TM y arteriosclerosis, con diferentes estudios en los que se relacionaba inversamente los niveles de sTM y enfermedad aterosclerótica, aunque no se aclaraba si era debido a la acción anti-inflamatoria de la sTM, o a una mayor expresión de TM en la membrana (Seigneur M *et al*, 1993a & 1995; Blann AD *et al*, 2000; Meter K *et al*, 1997; Mohri M *et al*, 1997a & 1998;

Auki Y *et al*, 1994; Tohda G *et al*, 1998; Grinnell BW *et al*, 1994 & 1996; Johansson L *et al*, 2002), o a su acción reguladora de la formación de la placa, vía su actividad anti-proliferativa en células musculares o vía inhibición de la ruta de las MAPKs-ERK. Así, es posible que mutaciones en el gen de la TM que alteren la expresión o activación de la PC predispongan al evento trombótico, ya sea venoso o arterial. Sin embargo, estas mutaciones son poco frecuentes en la población general, posiblemente debido a que la pérdida de las funciones de la TM, con implicaciones durante la reproducción o la respuesta a infecciones, son letales. Además, se ha observado una gran variabilidad en las frecuencias de los polimorfismos del gen de la TM, ya sea entre poblaciones dentro de un mismo grupo, como entre diferentes grupos étnicos, lo que ha dado lugar a resultados discrepantes respecto a su asociación con el riesgo de trombosis.

En la tabla 1.1.1.2.2. se resumen las mutaciones identificadas a lo largo de la secuencia codificante del gen de la TM. Así, cabe destacar el polimorfismo identificado en el dominio tipo lectina y que produce el cambio de aminoácido A43T, asociado con un aumento del riesgo de infarto de miocardio (Li YH *et al*, 2002; Doggen CJ *et al*, 1998b; Norlund L *et al*, 1997a & 1999). El polimorfismo localizado en el interdominio EGF₄-EGF₅, que produce el cambio de aminoácido Arg385Ser, reduce drásticamente la función anticoagulante de la TM (Kunz G *et al*, 2002; Glaser CB *et al*, 1992; Clarke JH *et al*, 1992). Otro polimorfismo ampliamente estudiado, y el primero descrito por van der Velden y colaboradores en 1991, es el C1418T, localizado en el dominio EGF₆ contiguo al dominio de unión de trombina y responsable de la activación de la PC. Produce el cambio de aminoácido Ala455Val. Aunque se le supone un papel regulador de la activación de PC, su asociación con el VTE (van der Velden PA *et al*, 1991; Öhlin A & Marlar R, 1995; Thude H *et al*, 2002; Faioni EM *et al*, 2002; Aleksic N *et al*, 2002; Chao TH *et al*, 2004) o el infarto de miocardio (Norlund L *et al*, 1997a; Ireland H *et al*, 1997; Wu KK *et al*, 2001) es contradictoria, sugiriendo una importancia reducida o restringida a un área geográfica particular (Öhlin A *et al*, 1997; Medina P *et al*, 2001; Nakazawa F *et al*, 1999). Nakabayashi y colaboradores (1999) demostraron que tanto el alelo A455 como V455 son equivalentes, con una molécula de TM que presenta la misma actividad como cofactor en la activación de la PC. Otro polimorfismo a destacar es la delección de 10 pb en posición 791-801, correspondiente a la Arg264 en el dominio EGF₂, que induce la aparición de un *codon* de parada de la traducción del gen de la TM en posición 306, causando la pérdida total de funcionalidad de la TM. Kunz y colaboradores, (2002) observaron una reducción en los niveles de sTM alrededor del 50%, así como la reducción en

la expresión de TM en estudios con heterocigotos *in vitro*. Los polimorfismos Arg385Ser, Pro477Ser, Pro483Leu reducen la expresión y/o actividad celular de la TM.

TABLA 1.1.1.2.2. PRINCIPALES MUTACIONES DESCRITAS EN LA SECUENCIA CODIFICANTE DEL GEN DE LA TROMBOMODULINA.

POLIMORFISMO (CAMBIO AA)	LOCALIZACIÓN	FENOTIPO ASOCIADO
-33G/A	Promotor	Infarto de miocardio, VTE, complicaciones durante el embarazo. Reducción actividad del promotor.
127G/A (A25T)	Dominio Lectina	Infarto de miocardio
396G/C (G61A)	Dominio Lectina	VTE
644G/C (P144A)	Dominio Lectina	?
Del 791-801 (STOP306)	Interdominio EGF ₁₋₂	Trombosis venosa sinusoidal. Produce un <i>codon</i> de parada y pérdida total de funcionalidad.
1252G/A (E346E)	Dominio EGF	?
1208G/A (R385K)	Interdominio EGF ₄₋₅	Infarto de miocardio
1209G/T (R385S)	Interdominio EGF ₄₋₅	VTE, infarto de miocardio Reducción expresión y actividad como cofactor de la activación de la PC.
E405P	Interdominio EGF ₄₋₅	Reducción expresión y actividad como cofactor de la activación de la PC, y del TAFI.
1418C/T (A455V)	Interdominio EGF ₆	Infarto de miocardio. Asociación con los niveles de sTM.
1456G/T (D468Y)	Dominio Ser/Thr	VTE, infarto de miocardio
1483C/T (P477S)	Dominio Ser/Thr	Reducción expresión y actividad como cofactor de la activación de la PC.
1502C/T (P483L)	Dominio transmembrana	VTE y complicaciones durante el embarazo. Reducción expresión y actividad como cofactor de la activación de la PC.
1689 ins T (A546)	Cola citoplasmática	Infarto de miocardio. Error en la pauta de lectura que altera el tamaño de la proteína (+61 aa), y reduce la expresión.

Sin embargo, los resultados son contradictorios, y ninguna de estas variaciones genéticas está claramente asociada con el VTE. Así, diferentes estudios ampliaron la búsqueda de variaciones genéticas en el gen de la TM a las regiones promotoras proximal y distal, y la región 3'UTR. De esta forma, cabe destacar el polimorfismo -33G/A, contiguo a la caja TATA, asociado con una menor expresión génica y con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, y

especialmente en población asiática (Ireland H *et al*, 1997; Le Flem L *et al*, 1998; Li YH *et al*, 2000 & 2001 & 2002; Öhlin A *et al*, 2004). Park y colaboradores (2002) han descrito, en población coreana, un desequilibrio de unión entre los polimorfismos -33G/A, 1418C/T y 1922C/T ($r^2=0,972$ -33G/A vs 1418C/T; $r^2=0,941$ -33G/A vs 1922C/T). Mientras que Sugiyama y colaboradores (2006) describieron, en población china, un desequilibrio de unión entre -33G/A y 2005G/A en la región 3'UTR ($r^2>0,8$), que podría explicar la disminución en la actividad del promotor de TM debido a que induciría un cambio conformacional en la región 3'UTR que alteraría la estabilidad del mRNA.

Diferentes estudios han definido los haplotipos más frecuentes en su población de estudio, según las diferentes combinaciones obtenidas para los polimorfismos que estudiaban, y mediante el empleo de programas informáticos específicos (Heit JA *et al*, 2005a; Kubisz P *et al*, 2005; Auro K *et al*, 2006; Sugiyama S *et al*, 2006; Olivot JM *et al*, 2008). En todos ellos se incluía el polimorfismo 1418C/T o 2729A/C.

1.1.1.3. COMPONENTES DE LA MEMBRANA CELULAR: GLICOLÍPIDOS.

La membrana celular juega un papel fundamental en las diferentes reacciones que ocurren durante la coagulación sanguínea, ya sea a través de los receptores para las diferentes proteínas de la coagulación anclados a la misma, o bien a través de la acción de sus componentes sobre las proteínas que componen el sistema hemostático, destacando fosfolípidos, lípidos y glicolípidos. Para estos últimos, su relación con la hemostasia no ha sido estudiada hasta muy recientemente. A partir de estudios *in vitro* se ha identificado la acción pro- o anticoagulante de los mismos (Griffin JH *et al*, 2001; Chatterjee S *et al*, 1998; Ye J *et al*, 1994; Bourin MC *et al*, 1993). Destacan con una acción procoagulante: triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (VLDL y LDL) (Vayá A *et al*, 2002a & 2007), y con una acción anticoagulante: fosfatidiletanolaminas (PE) (Klein S *et al*, 2001), cardiolípidos (Deguchi H *et al*, 2000), colesterol (Pecheniuk NM *et al*, 2005), lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Deguchi H *et al*, 2008; Mineo C *et al*, 2006; Griffin JH *et al*, 1999), lipoproteína A (Falcó C *et al*, 1998 & 2001; Estellés A *et al*, 1999; Ishibashi S *et al*, 2001; Zorio E *et al*, 2006a), los glicolípidos neutros glucosilceramida (GlcCer), globotriosilceramida o Gb3Cer (Deguchi H *et al*, 2001 & 2002 & 2004; Yegneswaran S *et al*, 2003) y esfingosina (Sph) (Deguchi H *et al*,

2004 & 2008; Kohyama-Koganeya A *et al*, 2004). El mecanismo por el cual ejercen sus actividades pro- o anticoagulantes resulta desconocido. Se ha descrito que la fosfatidilserina mejora la activación de la PT vía el complejo FXa/FVa, o que la lipoproteína plasmática VLDL promueve la actividad del complejo protrombinasa, al contrario que HDL, que mejora la actividad anticoagulante de la PS vía APC (Griffin JH *et al*, 1999; Bradley WA *et al*, 1988; Moyer MP *et al*, 1998; Xu N *et al*, 1998). El balance entre ellos favorece un aumento o disminución en la generación de trombina, contribuyendo a un aumento o disminución del riesgo de trombosis venosa o arterial.

Nosotros hemos centrado nuestro estudio en los **glicolípidos o glucoesfingolípidos (GSLs)**. Constituyen un importante componente de la membrana celular. Están constituidos por una porción hidrofóbica compuesta por Sph, que queda embebida en la membrana y le confiere rigidez, y otra porción hidrofílica formada por cadenas de azúcares, que quedan expuestas al medio extracelular a modo de receptores de superficie celular, y le confiere la especificidad para interactuar con anticuerpos, hormonas, toxinas bacterianas o proteínas de la cubierta viral (Brown DA *et al*, 2000). Su biosíntesis se da a partir de la acetilación de la Sph por un ácido graso dando la ceramida, a la que posteriormente se añaden desde simples monohexosas a cadenas complejas de múltiples azúcares dando los diferentes GSLs. Además, los GSLs forman, unidos a lipoproteínas, microdomínios de membrana resistentes a la acción de detergentes (“*lipid rafts*” o DRM), con implicaciones en la señalización y transporte de lípidos y proteínas en la ruta de endocitosis (Brown DA *et al*, 2000; Mattjus P *et al*, 2002; Hein LK *et al*, 2008).

Se clasifican en 3 subclases según los residuos que se añaden a la ceramida:

1. NEUTROS formados por ceramida y al menos un residuo de azúcar.
2. GANGLIÓSIDOS que contienen ceramida, azúcares y ácido siálico y/o ácido N-glicolilneuramínico.
3. SULFATIDAS que contienen ceramida, azúcares y sulfatos.

También atienden a la clasificación según su estructura central en:

1. LACTOSERIES: R-GlcNAc β 1
2. GLOBOSERIES: R-Gal α 1
3. GANGLIÓSIDOS: R-GalNAc β 1

Su catabolismo ocurre vía la acción de glicohidrolasas lisosomales. Alteraciones en su catabolismo produce la acumulación de GSLs. Estas alteraciones metabólicas o glucoesfingolipidosis, son generalmente resultado de la aparición de

mutaciones en los genes que codifican para las diferentes glicohidrolasas. La enfermedad más prevalente relacionada con el metabolismo de los GSLs es la ENFERMEDAD DE GAUCHER, debida a una deficiencia de la enzima β -glucocerebrosidasa o GBA, que provoca la acumulación lisosomal de GlcCer, afecta a hígado, bazo y médula, y provoca anemia y trombocitopenia (tipo 1 asociada con una deficiencia parcial del enzima), o complicaciones a nivel neuronal (tipo 2 y 3 asociadas con deficiencias severas) (Germain DP *et al*, 2004). También se ha descrito la ENFERMEDAD DE FARBER debida a la ausencia de actividad ceramidasa, que produce la acumulación lisosomal de ceramida, y afecta órganos neuronales y viscerales, o la ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK debida a la ausencia de esfingomielinasa ácida, que causa neuropatías y muerte.

Los GSLs están implicados en la regulación de diferentes procesos celulares fundamentales, como la diferenciación, proliferación celular y apoptosis. Intervienen además en la migración, morfogénesis, interacciones célula-célula y célula-matriz, en la transducción de señales, transporte iónico y adhesión celular, o en el correcto funcionamiento del sistema nervioso central y la formación de mielina. Además, se ha visto que tienen funciones pro- y anticoagulantes, gracias a su capacidad de regular la generación de trombina, coagulación sanguínea y trombosis (Yamashita T *et al*, 2002; Sillence DJ *et al*, 2002; Uchida Y *et al*, 2002; Boldin SA *et al*, 2000; Deigner HP *et al*, 2001; Yamashita T *et al*, 1999; Futerman AH *et al*, 1999; Furuya S *et al*, 1998; Hirabayashi Y *et al*, 1997).

Con acciones pro- o anticoagulantes destacan: **esfingosina** o esfingolípido intermediario entre ceramida y esfingosina-1-fosfato (S1P), y sus análogos (dimetil-Sph, trimetil-Sph y fito-Sph), que inhiben la generación de trombina mediante los grupos amino de su cadena alifática, que se unen al dominio Gla del FX, de forma independiente a la presencia de Ca^{2+} , inhibiendo la actividad del complejo protrombinasa, al impedir la unión del FXa y el FVa, y por tanto el paso de PT a trombina. Además, el dominio Gla del factor FX es importante para su activación por el FVIIa a partir de la vía extrínseca de la coagulación, quedando también inhibido. Este mecanismo de regulación negativa aparece durante los procesos de inflamación asociados con mecanismos de apoptosis y proliferación celular, ya que durante la apoptosis la S1P es hidrolizada, aumentando los niveles de Sph, inhibiéndose así la generación de trombina y disminuyendo la inflamación generada durante la apoptosis. Aunque en casos de inflamación generalizada, las citoquinas estimulan el paso de ceramida a S1P, disminuyendo los niveles de Sph, permitiéndose la generación de trombina que activa la coagulación y producción de

factor tisular para generar más trombina. Así, S1P y trombina deben actuar sinérgicamente estimulando los procesos proinflamatorios y coagulantes. La interconversión de estos GSLs modula sus actividades en uno u otro sentido, modificando su capacidad de regular la generación de trombina. (Deguchi H *et al*, 2004). Y los **glicolípidos neutros**, que circulan en sangre asociados con las lipoproteínas plasmáticas: LDL, VLDL y HDL, e incluyen: GlcCer, Gb3Cer, lactosilceramida y Gb4Cer. (Deguchi H *et al*, 2001 & 2002).

La **glucosilceramida (GlcCer)** es la forma precursora de más de 300 glicolípidos. Es un glicolípido neutro derivado de la ceramida y que pertenece al grupo de los cerebrósidos, constituidos por un grupo amino alcohol alifático insoluble en agua, la ceramida, al que se unen covalentemente residuos de azúcares (D-Glc) mediante enlaces β 1-Glc. Constituye un componente importante de la doble capa lipídica de la membrana celular, y participa activamente como biorregulador en una gran variedad de procesos: transporte y señalización intracelular, interviniendo en el metabolismo lisosomal y existiendo una integración entre el metabolismo de GSLs y colesterol (Perry RJ *et al*, 2005; Fuller M *et al*, 2008; Pagano R, 2003; Sillence DJ *et al*, 2002; Garner B *et al*, 2002), desarrollo y diferenciación celular, apoptosis y supervivencia celular. (Kohyama-Koganeya A *et al*, 2004; Grazide S *et al*, 2004; Oku H *et al*, 2007). La GlcCer está presente en plasma a concentraciones entre 2 y 12 μ g/ml.

1.1.1.3.1. El glicolípido neutro glucosilceramida y la coagulación

Aunque existen pocos estudios, se ha descrito una asociación entre el glicolípido neutro GlcCer y la función anticoagulante de la proteína C. Así, mediante estudios con proteínas purificadas se observó que tanto la GlcCer como su análogo estructural, la Gb3Cer, incorporadas a vesículas con fosfatidilserina y fosfatidilcolina, aceleran la unión de la APC a los residuos Arg306, Arg506 y Arg679 del FVa, además de estimular la unión de la PS a los residuos 493-506 del FVa. De esta forma acelera la inactivación del FVa por la APC, al mismo tiempo, y puesto que el FVa presenta competencia de unión por los mismos residuos para PS y FX, disminuye la actividad protectora del FX por proteger al FVa de la inactivación por el APC (Deguchi H *et al*, 2001 & 2002 & 2004; Yegneswaran S *et al*, 2003). Además, en un estudio caso-control con pacientes con historia de VTE se observó que los niveles plasmáticos de GlcCer eran menores en los individuos que habían sufrido un VTE. Todo ello sugería que la GlcCer plasmática podía actuar

como cofactor anticoagulante del complejo APC:PS, de forma que deficiencias de GlcCer podrían ser un riesgo de VTE (Deguchi H *et al*, 2001 & 2002).

En un estudio previo realizado por nuestro grupo, se midieron los niveles de APC y GlcCer en 106 pacientes (56 mujeres y 50 hombres) con historia de VTE, sin tratamientos con anticoagulantes orales ni presencia de defectos trombofílicos conocidos, y 106 controles, observando que los resultados apoyaban la hipótesis descrita por los anteriores autores. Además, se observó que tanto deficiencias de APC como de GlcCer por separado aumentaban el riesgo de APC, pero que una deficiencia simultánea de APC y GlcCer elevaba aún más dicho riesgo, sugiriendo un efecto de asociación entre ambos parámetros (España F *et al*, 2003). A partir de este estudio previo y en el grupo de pacientes con VTE y bajos niveles de GlcCer, se encontró que en algunas familias varios de sus miembros tenían deficiencias de GlcCer. Puesto que la GlcCer se sintetiza a partir de la ceramida por acción de la glucosilceramida sintasa, planteamos la hipótesis que mutaciones funcionales en el gen que codifica para esta enzima podrían causar una reducción en la síntesis de GlcCer, y con ello, niveles plasmáticos reducidos de GlcCer, aumentando el riesgo de VTE y explicando el carácter hereditario de esta deficiencia.

1.1.1.3.2. Estructura del gen que codifica para la glucosilceramida sintasa

La UDP-glucosa ceramida glucosiltransferasa (UGCG), también: glucosilceramida sintasa (GCS); ceramida glucosiltransferasa; GlcT-1; UDP-glucosa:ceramida β 1-1' glucosiltransferasa; o UDP-glucosa:N-acilesfingosina D-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.80) es la enzima clave para la regulación de los niveles intracelulares de ceramida y biosíntesis del resto de GSLs. Cataliza la transferencia de un residuo de glucosa, procedente de la UDP-glucosa, a la ceramida, procedente del retículo endoplásmico, dando la GlcCer (Yamashita T *et al*, 2002; Ichikawa S *et al*, 1998a; Komori H *et al*, 2000). Es una proteína integral de membrana tipo III, compuesta por 394 aminoácidos, con una masa molecular de 38 kd (Watanabe R *et al*, 1998). Estructuralmente consta de un dominio o secuencia señal de anclaje y una larga cola citoplásmica cerca del extremo N-terminal, que interacciona con el substrato, y varias regiones hidrofóbicas cerca del extremo C-terminal, que interaccionan con la membrana celular. La estructura de esta proteína es diferente al resto de glucosiltransferasas implicadas en la biosíntesis de GSLs, indicando una localización citoplasmática, y no en el espacio luminal del aparato de Golgi donde se localizan el resto. Así, una vez sintetizada, la

GlcCer tendrá que ser translocada al espacio luminal del aparato de Golgi donde es glicosilada, dando las diferentes familias de GSLs.

El gen de la UGCG (GeneID:7357) consta de 9 exones y 8 intrones, se halla localizado en la región 9q31, su tamaño es de 32 kb y está formado por 1185 nucleótidos. La región promotora carece de cajas TATA y CAAT, y es rica en secuencias GC. Contiene sitios de unión para los factores de transcripción Sp1, indicador de genes de expresión constitutiva, AhR, NF- κ B, AP-2 y GATA-1 (Ichikawa S *et al*, 1996 & 1997 & 1998; Watanabe R *et al*, 1998). Además, es un gen altamente conservado, existiendo homologías entre el gen de la UGCG humano y 11 especies diferentes.

Puesto que es una enzima clave en la biosíntesis de GSLs, se ha estudiado y comprobado la regulación de la expresión y actividad enzimática para este enzima en respuesta a estrés y muerte celular, diferenciación celular, tratamientos con fármacos, etc. Además, la UGCG está implicada en la regulación del contenido celular de ceramida, sobre todo en situaciones de acúmulo (Uchida Y *et al*, 2002; Komori H *et al*, 1999 & 2000). Y al contrario, también se ha descrito una activación de la expresión y actividad de UGCG, y por tanto de la síntesis de GlcCer, mediada por ceramida. Esta regulación se produciría a nivel transcripcional mediante la unión en la región promotora de factores de transcripción específicos. También se ha descrito una regulación post-transcripcional mediada por ceramida en presencia de cicloheximida (Komori H *et al*, 1999). Recientemente, se ha descrito que la proteína citosólica c-Fos activa la expresión de UGCG, estimulando así la síntesis de GSLs. Es una acción independiente de su actividad como factor de transcripción tipo AP-1, vía asociación con el retículo endoplásmico, y gracias a su capacidad de activación de proteínas clave en la síntesis de membrana *in novo*. (Crespo PM *et al*, 2008).

La UGCG es una enzima con cierta relevancia clínica, tanto por su implicación en patologías relacionadas con el metabolismo de GSLs, como por su implicación en la resistencia a tratamientos con fármacos anti-tumorales y regulación de la apoptosis inducida por ceramida. (Chatterjee S *et al*, 1996; Lee L *et al*, 1999; Jimbo M *et al*, 2000; Gonazé-Anderson V *et al*, 2004 & 2007) y por ello la importancia del desarrollo de fármacos que inhiban la UGCG.

1.1.1.3.3. Mutaciones descritas en el gen de la glucosilceramida sintasa

Existen 287 polimorfismos descritos para el gen de la UGCG en humanos (información obtenida de la página del National Center for Biotechnology Information (NCBI) Single Nucleotide Polymorphism (SNP). En la tabla 1.1.1.3.3. se resumen las principales características.

TABLA 1.1.1.3.3. LISTADO DE POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS EN EL GEN DE LA UGCG

LOCALIZACIÓN	Nº DE CASOS	MUTACIÓN
PROMOTOR	17	
región 5' UTR + EXÓN 1 (mRNA posición 21)	1	rs7871397 A / C / G
INTRÓN 1	122	
INTRÓN 2	70	
EXÓN 3 (mRNA posición 539)	1	rs36015756 A / G ; Val83Val
INTRÓN 3	12	
EXÓN 4 (mRNA posición 638)	1	rs1134931 C / T ; Gly116Gly
INTRÓN 4	4	
EXÓN 5 (mRNA posición 749)	1	rs17853855 A / G; Thr153Thr
INTRÓN 5	26	
EXÓN 6 (mRNA posición 1015)	1	rs62570269 T / C; Ala242Val
INTRÓN 6	8	
INTRÓN 7	10	
EXÓN 8 (mRNA posición 1151) (mRNA posición 1303)	2	rs7850023 A / G; Thr287Thr rs71797735 - / gran delección;frameshift
INTRÓN 8	5	
EXÓN 9 + región 3' UTR (mRNA posición 1630) (mRNA posición 1634)	2	rs72379562 - / A rs71742290 - / AA
3' downstream	4	

(Última actualización realizada en Septiembre de 2009)

1.2. - OTRAS FUNCIONES DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C

Diversos estudios han evidenciado la existencia en las moléculas de APC, TM y EPCR de diferentes dominios a nivel estructural, regulador y funcional, implicados en diferentes funciones biológicas, como la coagulación, fibrinólisis, inflamación, apoptosis y neuroprotección. Estas “nuevas” funciones del sistema de la proteína C se están demostrando que pueden ser potencialmente importantes en el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas en enfermedades tales como la sepsis grave, enfermedad inflamatoria intestinal, ictus isquémico, daño pulmonar, pancreatitis, o terapia contra el cáncer.

1.2.1. ACCIONES ANTIINFLAMATORIAS

En condiciones normales, el endotelio está protegido mediante el bloqueo de la formación de trombina y mediante la generación de niveles adecuados de APC para proteger la vasculatura de procesos inflamatorios, procoagulantes y

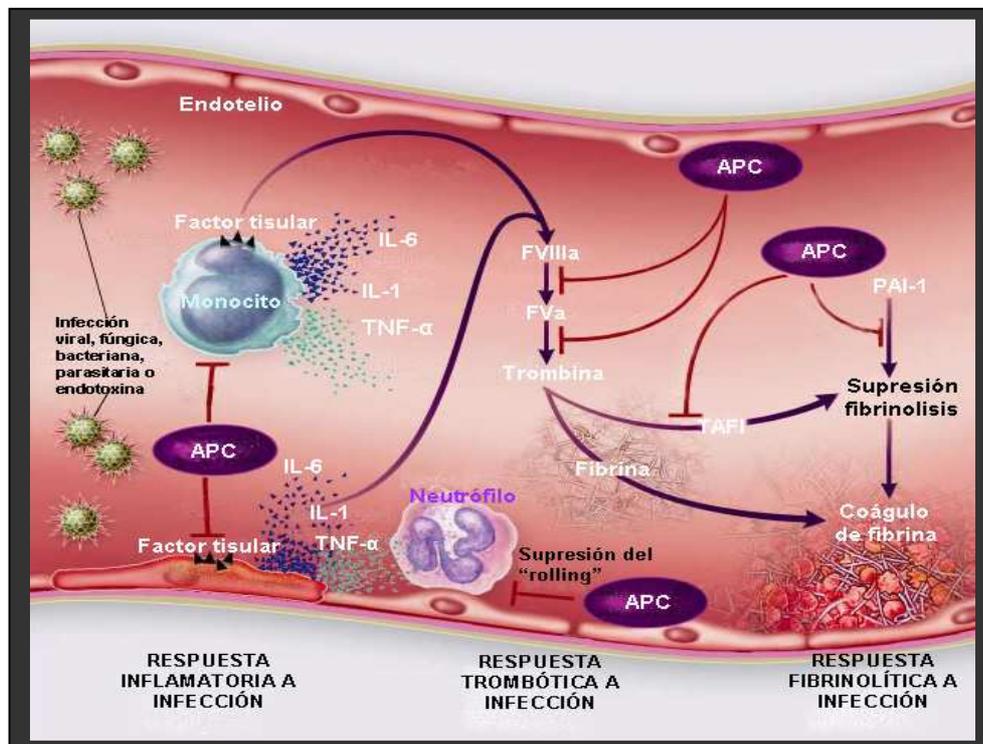


FIGURA 1.2.1.1. Esquema de la acción antiinflamatoria del APC (Modificado de Bernard G *et al*, 2001b).

proapoptóticos. Sin embargo, en situaciones de daño celular y/o inflamación, el sistema hemostático se desplaza a favor de la trombosis (Figura 1.2.1.1).

Tras el daño endotelial, se libera TNF α y otras citocinas pro-inflamatorias (Grey ST *et al*, 1994), que mediado por el factor nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), inhiben la expresión de EPCR y TM en la superficie celular, bien vía transcripcional o mediante mecanismos de endocitosis, generándose una menor cantidad de APC, y permitiendo que la trombina ejerza sus actividades procoagulantes y pro-inflamatorias, mediadas por plaquetas, monocitos, fibrinógeno o la propia célula endotelial. Además, se favorece la unión de leucocitos, selectinas, y moléculas de adhesión V-CAM e I-CAM, al eliminarse el bloqueo mediado por PC/APC y TM (Grinnell BW *et al*, 1994; Esmon CT & Fukudome K, 1995a; Joyce DE *et al*, 2001; Weiler H *et al*, 2004) (Figura 1.2.1.2).

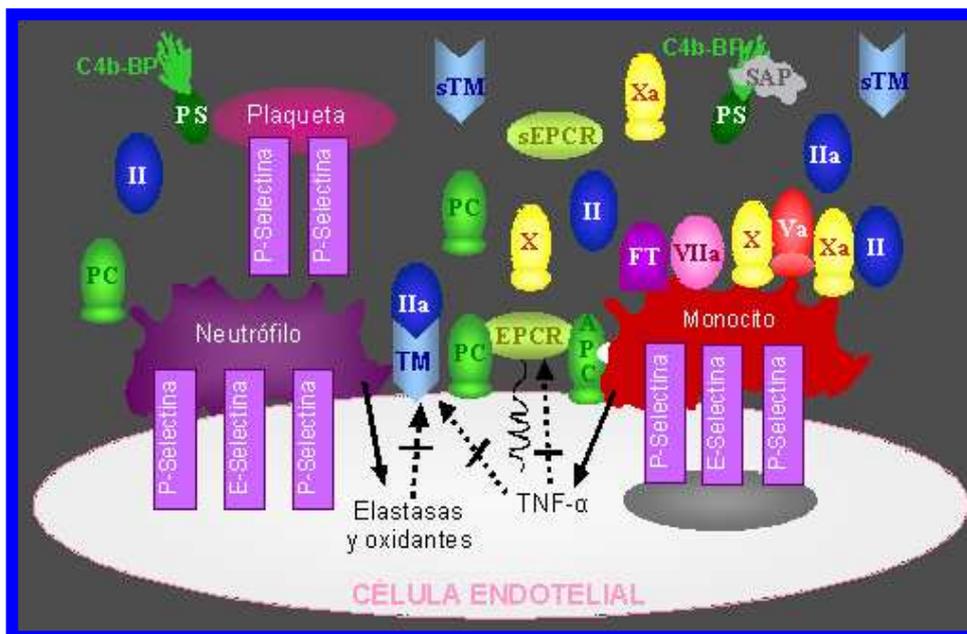


FIGURA 1.2.1.2. Esquema de las diferentes moléculas implicadas en la inflamación (Modificado de Esmon CT & Fukudome, 1995).

Por otra parte, los leucocitos migran al sitio donde se ha originado el daño celular, oxidando el residuo Met388 de la TM, con lo que se impide la unión de PC y por tanto la activación de APC, favoreciendo la formación del coágulo local, y activa la escisión de TM de la membrana, con lo que aumentan los niveles de sTM en plasma. Al disminuir la TM anclada a la membrana, disminuyen los dominios

lectina, activándose la vía de las MAPKs, favoreciendo la adhesión y migración de moléculas y la extravasación de leucocitos a sitios con daño endotelial, y desaparece la protección anti-apoptótica. De la misma manera, aumentan los niveles de sEPCR, disminuyendo la capacidad de generación de APC. De forma que se genera un círculo vicioso que promueve la inflamación, disfunción endotelial y destrucción del tejido. Los tejidos adyacentes no afectados serán los encargados de revertir la situación. Así, se produce un aumento de la expresión de TM inducida por el estrés y aumento de la temperatura, que produce un aumento local de la generación de APC, con la consecuente inhibición de las actividades procoagulantes, proinflamatorias y antifibrinolíticas de la trombina. La APC inhibe al PAI-1, aumentando la fibrinólisis. Y además, los fragmentos de sEPCR y sTM generados reducen la inflamación, promueven mecanismos de supervivencia y proliferación celular, e intervienen en las interacciones entre leucocitos activados-célula endotelial (Van de Wouwer M *et al*, 2004a).

Hay evidencias clínicas de que el sistema de la PC está envuelto en los procesos inflamatorios. Así, en la fase aguda de la enfermedad denominada fiebre Mediterránea, en donde la microvasculatura está ampliamente inflamada, hay una activación generalizada del sistema de la PC, resultando en un consumo de PC y su principal inhibidor plasmático, el PCI, con la consiguiente aparición de complejos APC:PCI (Vicente V *et al*, 1991), sugiriendo que esta vía está envuelta en la interacción entre la coagulación y la inflamación, y demostrando la utilidad de estudiar el sistema de la PC en situaciones clínicas donde están presentes procesos inflamatorios tales como la vasculitis (Alcaraz A *et al*, 1995).

Estudios en animales de experimentación también sugerían que el sistema de la PC puede actuar como un mecanismo regulador de los procesos inflamatorios. Así, diversos experimentos en animales mediante infusión de APC indicaban que el sistema de la PC podría estar envuelto en la regulación de la respuesta inflamatoria. La infusión de APC en babuinos demostró que el APC reducía la mortalidad inducida por *E. coli* (Taylor F.B.Jr *et al*, 1987). En otros experimentos, la administración a babuinos de dosis subletales de *E. coli* y anticuerpos monoclonales bloquean la interacción PC:EPCR. El animal experimentaba coagulación intravascular diseminada, infiltración de leucocitos, fallo orgánico y muerte (Taylor, F.B.Jr *et al*, 2000). Estos datos sugieren que un sistema de la PC efectivo es esencial para la defensa del huésped frente a la sepsis. A este respecto, se ha visto que la APC puede reducir directamente la producción de citocinas proinflamatorias así como la expresión de factor tisular en diversos modelos

(White B *et al*, 2000; Esmon CT, 2002; Cheng T *et al*, 2003). Así, el complejo EPCR:APC puede translocarse al núcleo del monocito y modular la expresión de determinados genes inflamatorios, modulando la respuesta proinflamatoria.

La TM puede ejercer funciones antiinflamatorias a diversos niveles, algunas de ellas independientes de la vía de la PC (Weiler H *et al*, 2003). Por ejemplo, formas de TM recombinante protegen al animal en modelos de coagulación intravascular diseminada o daño pulmonar inducidos por TF o endotoxinas. El EPCR también puede exhibir funciones antiinflamatorias independientes de la APC. Así, el sEPCR es capaz de unirse y activar a los neutrófilos (Kurosawa S *et al*, 2000) y esta interacción reduce la fuerte unión del neutrófilo al endotelio activado.

1.2.2. PROLIFERACIÓN CELULAR

Asimismo, se ha observado que la TM puede funcionar como una molécula de adhesión entre células, puesto que el dominio tipo lectina de la TM induce la agrupación de las células que se encuentran próximas en cultivo promoviendo la adhesión célula-célula a través de la interacción de sus moléculas de TM mediada por calcio (Hasegawa N *et al*, 1996). Esta interacción podría ejercer un papel limitante del crecimiento celular. Además, Shi y colaboradores (2005) generaron una molécula de TM recombinante con 6 dominios tipo EGF y un dominio rico en Ser-Thr, el cual induce la neovascularización y estimula la expresión de metaloproteasas y activadores del plasminógeno que median la proteólisis extracelular favoreciendo la invasión celular y la migración durante la angiogénesis. Estos resultados sugieren que los fragmentos de la TM podrían jugar un papel importante en la formación de nuevos vasos. Además, la TM se expresa sobre la superficie de las células tumorales y parece jugar un papel en el cambio hemostático que ocurre alrededor de los tumores malignos. Así, existe una buena correlación entre la pérdida de expresión de TM y un estado avanzado y/o mal pronóstico, así como entre los niveles plasmáticos de sTM y la progresión del cáncer en varios tipos de tumores.

1.2.3. INMUNIDAD

También cabe destacar un efecto indirecto mediado por TAFI, que es el principal enzima responsable de la inactivación de sustancias vasoactivas, como la anafilatoxina C3a y C5a, generadas durante la activación del complemento (Campbell WD *et al*, 2002; Myles T *et al*, 2003; Nishimura T *et al*, 2007). Así, la

presencia de elevadas concentraciones de TM en la microcirculación, llevaría a la rápida activación del TAFI y la subsiguiente rápida inactivación de la C3a y C5a, mecanismo a través del cual la TM ejercería un papel protector de la microvasculatura frente al daño causado al desencadenarse el sistema del complemento en situaciones como enfermedades infecciosas y transfusiones incompatibles. También, estudios *in vitro* demostraron que la TM protege frente a la activación del complemento, al favorecer la inactivación del C3b mediada por el cofactor factor I (CFI), en presencia de los cofactores factor H (CFH) y/o C4b-BP. Y recientemente se ha observado la asociación entre mutaciones en el gen que codifica para la TM y el síndrome hemolítico urémico D o atípico, en el que en el 50% de los casos se desconocen los factores genéticos que regulan el sistema de activación del complemento, y sus manifestaciones clínicas son la predisposición al daño endotelial y trombosis microvascular (Delvaeye M *et al*, 2009).

1.2.4. ACCIONES CITOPROTECTORAS

En los últimos años se le ha otorgado nuevas funciones citoprotectoras a la APC, tanto antiapoptóticas como neuroprotectoras. Estas funciones son dependientes del EPCR, ya que el EPCR se encarga de localizar a la APC en los dominios donde se encuentra el PAR-1 (Bae JS *et al*, 2007). Como hemos visto, tras la activación de la PC, la APC unida al EPCR, activa al PAR-1 en la membrana de la célula endotelial, mediante corte proteolítico, iniciándose la señalización celular que conduce a las diferentes funciones citoprotectoras de la APC.

Existen evidencias de dicha actividad de la APC tanto *in vitro* como *in vivo* (Griffin JH *et al*, 2007). Principalmente, conllevan a la alteración en los patrones de expresión génica, mediante inhibición de la expresión de proteínas de la ruta apoptótica intrínseca, como p53 y Bax, y sobre-expresión de proteínas tipo Bcl-2. (Mosnier LO *et al*, 2007a & 2007b). También se ha descrito que reduce la señalización mediada por caspasa-3 (Cheng T *et al*, 2003). La APC también parece capaz de bloquear la ruta apoptótica extrínseca porque contrarresta la neurotoxicidad del tPA, el cual ejerce una actividad proapoptótica dependiente de la caspasa-8 (Liu D *et al*, 2004). Sin embargo, O'Brien y colaboradores (2007), han identificado un mecanismo por el cual la APC ejerce su actividad antiapoptótica sin la mediación del EPCR. La APC activa la ruta ERK, factor que induce la expresión del factor de transcripción ERG-1, que a su vez actúa como supresor de TRAIL, un factor que se expresa en la mayor parte de tipos celulares y tejidos y es capaz de

inducir apoptosis. Para desarrollar esta actividad anti-apoptótica la APC debe unirse al PAR-1, pero no se requiere la presencia del EPCR. Además, en modelos de ratón con endotoxemia la APC redujo la apoptosis al mejorar la supervivencia por sepsis (Mosnier LO, 2004). En pacientes con sepsis severa, la molécula de APC recombinante XI-GRISTM redujo la apoptosis de células sanguíneas circulantes (Bibault P *et al*, 2007).

Recientemente, también se ha implicado al sistema de la proteína C en los procesos de estabilización de la barrera endotelial. Las células endoteliales forman una barrera estable y dinámica en la interfase sangre-tejido. La ruptura de esta barrera supone la infiltración de células y mediadores de la inflamación al espacio intravascular, y es un factor clave en los procesos inflamatorios. Los efectos protectores de la barrera endotelial están mediados por la vía APC-EPCR:PAR-1. La activación del PAR-1 por APC estimula a la esfingosina kinasa-1 (SphK-1) a producir S1P a partir de Sph. S1P activa al receptor esfingosina-1-fosfato 1(S1P₁) lo que promueve la protección de la barrera endotelial, antiapoptosis y reducción de la expresión de moléculas de adhesión. Al contrario que para la APC, concentraciones elevadas de trombina actúan a través de PAR-1 causando la desestabilización de la barrera endotelial (Feistritz C *et al*, 2005; Finigan JH *et al*, 2005). Esta regulación de la estabilidad de la barrera endotelial mediada por la APC o la trombina depende del nivel de inducción de S1P. Además, los efectos de la estabilización de la barrera endotelial parecen ser más efectivos cuando son producidos por la APC generada endógenamente, que cuando son inducidos por APC añadida de manera exógena (Feistritz C *et al*, 2006b). Estos datos, apoyan la idea que la generación endógena de APC promovería la integridad vascular y limitaría las hemorragias cuando la trombina es generada localmente.

S1P, además de promover la estabilización de la barrera endotelial, también media señales antiapoptóticas. Este mecanismo está mediado por el ratio ceramida:Sph, mediadores de apoptosis o supervivencia celular respectivamente (Chatterjee S *et al*, 1996; Kohyama-Koganeya A *et al*, 2004), como ocurre con el mantenimiento de la homeostasis de la barrera epidérmica, donde otro metabolito de la ceramida, la GlcCer, es crítico para el mantenimiento de la homeostasis de dicha barrera (Chujor CS *et al*, 1998). Como estudiaremos más adelante, la GlcCer potencia la actividad anticoagulante de la APC, lo que sugiere que las interacciones entre la ruta reguladora de los GSLs y la ruta de la PC, podrían jugar un papel relevante.

1.3. - SISTEMA CARDIOVASCULAR: INFARTO DE MIOCARDIO

1.3.1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR: DESCRIPCIÓN Y FACTORES DE RIESGO

La enfermedad cardiovascular se define como un desorden generalizado del árbol vascular, caracterizado por la formación de una placa de ateroma, agregación plaquetar e inflamación, que culmina con la ruptura de la placa y la formación del trombo, comprometiendo a la circulación sanguínea. La enfermedad arterotrombótica subyace en la mayoría de pacientes con cardiopatía isquémica. La cardiopatía isquémica constituye una de las primeras causas de mortalidad en las sociedades desarrolladas del mundo actual. El infarto de miocardio normalmente ocurre tras oclusión trombótica aguda, debida a la ruptura de la placa ateromatosa., afecta principalmente a los grandes vasos, y explica el 60% de la mortalidad en los países desarrollados.

Un factor de riesgo cardiovascular es una característica biológica o conducta que aumenta la probabilidad de padecer o morir de enfermedad cardiovascular en aquellos individuos que la presentan (TABLA 1.3.1). Fueron definidos en el Estudio Framingham (Kannel WB *et al*, 1961), y actualmente se pueden dividir en tres tipos: factores de riesgo causales, predisponentes y condicionales. Las dos primeras categorías se asocian con la gravedad de la enfermedad y su papel causal, la tercera se asocia con un mayor riesgo de enfermedad pero no hay evidencia definitiva acerca de su papel causal, ya sea porque su potencial aterogénico es menor que el de los otros factores principales, o porque su frecuencia en la población sea insuficiente (Grundy SM *et al*, 1999). Sin embargo, diversos trabajos han demostrado que en un grupo considerable de pacientes con infarto de miocardio, los factores de riesgo cardiovascular clásicos no tienen suficiente relevancia como para justificar el desarrollo clínico de esta enfermedad. De hecho, entre un 50% y un 70% de los casos de cardiopatía isquémica crónica no se pueden justificar por la presencia de estos factores de riesgo (Navarro-López F *et al*, 2002).

TABLA 1.3.1. PRINCIPALES FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.

FACTORES DE RIESGO CAUSALES *	FACTORES DE RIESGO PREDISPONENTES	FACTORES DE RIESGO CONDICIONALES
Tabaquismo	Obesidad	Triglicéridos séricos elevados
Hipertensión arterial	Obesidad abdominal	Partículas pequeñas de LDL
Colesterol y LDL elevados	Sedentarismo	Hiperhomocisteinemia
HDL bajos	Historia familiar	Lipoproteína (a) elevada
Diabetes mellitas	Género	Fibrinógeno elevado
Edad avanzada	Grupo étnico	PAI-1 y TAFI aumentados
	Factores psico-sociales	Proteína C reactiva elevada
	Estrés	Disfibrinogenemias
	Alcohol	

* Factores de riesgo cardiovascular clásicos

El registro IBERICA, por ejemplo, compuesto por pacientes de entre 25 a 74 años ingresados por infarto de miocardio en Navarra entre 1997 y 1998, mostró que en una población joven (hasta 44 años) con infarto de miocardio, el 2% de los hombres y el 20% de las mujeres carecen de factores de riesgo cardiovascular clásicos, mientras que el 36% y 80% respectivamente, son portadores tan sólo de un factor de riesgo (Moreno C *et al*, 2002). Así, los factores de riesgo cardiovascular clásicos no son capaces de explicar totalmente las variaciones observadas en la prevalencia y gravedad de la cardiopatía isquémica. Este dato es especialmente relevante en pacientes jóvenes, en los que su angiografía para las arterias coronarias es normal, y en los que un porcentaje considerable apenas tienen factores de riesgo, y si los hay, han tenido poco tiempo para ejercer un efecto deletéreo sobre la pared vascular, siendo más prevalentes los factores de riesgo asociados a la historia familiar. De forma que deben actuar otros sistemas o factores adicionales en el origen del infarto de miocardio, que modulen o potencien a los factores clásicos.

Por otra parte, cabe destacar la alta frecuencia de afectación cardiovascular en la descendencia. Se sabe que los familiares de primer grado de un paciente afecto tienen un riesgo siete veces mayor que las personas sin antecedentes familiares (Fuster V *et al*, 1992. Parte 1 y 2). Así, la existencia de las mutaciones en los genes que codifican para las proteínas implicadas en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular podría ser otro factor de riesgo a tener en cuenta (Auro K *et al*, 2007; Knowles JW *et al*, 2007).

1.3.2. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

La aterotrombosis es una patología de carácter multifactorial, está caracterizada por el engrosamiento y obstrucción del lumen arterial y es un proceso complejo que implica a diferentes tipos de células (endoteliales, musculares lisas, macrófagos y linfocitos), numerosas familias de citocinas y factores de crecimiento, y que afecta de forma selectiva al árbol arterial como resultante de la acción combinada de factores genéticos y ambientales. La coexistencia de uno o más factores de riesgo inducen alteraciones en el endotelio vascular que resultan finalmente en la inducción de una respuesta inflamatoria por parte de las células endoteliales, monocitos, etc (Schiuekofer S *et al*, 2000; Poredos P, 2000). Esta disfunción puede ser el resultado de un daño mecánico, inducido por la hipertensión, o un daño bioquímico causado por otros factores como el tabaco, diabetes e hipercolesterolemia. Durante el proceso inflamatorio, los monocitos secretan citocinas inflamatorias que a su vez estimulan a la célula endotelial, liberando más citocinas y moléculas adhesivas, y facilitando el reclutamiento de células inmunes hacia los tejidos (Ross R *et al*, 1993). Los linfocitos y monocitos reconocen las glicoproteínas adhesivas expresadas en la célula endotelial activada, selectinas, PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1, permitiendo su unión a la superficie del endotelio y facilitando su migración hacia el interior de la pared vascular. Este proceso se ve favorecido por la acción de los factores de crecimiento y sustancias quimiotácticas liberadas por las células endoteliales y los monocitos adheridos (IL-8, leucotrienos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, MCP-1 o PECAM-1), y por la propia inflamación, que produce un aumento de la permeabilidad, lo que favorece el influjo de lipoproteínas y otras proteínas plasmáticas a la íntima.

En el espacio subintimal y la capa media arterial, los monocitos se diferencian en macrófagos, los cuales acumulan lípidos nativos y oxidados en el interior de la pared arterial, y actúan estimulando la activación del factor nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), que interviene en la expresión y liberación de moléculas intermediarias que atraen a nuevos monocitos, linfocitos T, mastocitos y células musculares lisas al lugar de la inflamación, todo lo cual contribuye al crecimiento de la placa de ateroma (Guyton JR *et al*, 1996). Este macrófago genera la típica morfología de la célula espumosa característica de las lesiones ateroscleróticas. Además, algunas de las citocinas y factores de crecimiento liberados, como el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas, estimulan la síntesis de colágeno. Por el contrario, los linfocitos T activados pueden producir otros factores, como el interferón- γ (INF- γ), que alteran

la síntesis de colágeno de las células musculares lisas e inhiben su proliferación (García-Moll X *et al*, 2000), alterando el mantenimiento y reparación de la matriz de colágeno. Además, las placas activas expresan metaloproteasas de matriz extracelular que también inducen la degradación del colágeno y otros componentes de la matriz en las placas ateroscleróticas (Libby P *et al*, 1995). Por otra parte se forma un núcleo lipídico alrededor de la placa, sintetizando proteínas que brindan resistencia a la placa de ateroma, tales como el colágeno, los proteoglicanos y la elastina (Miranda-Guardiola F *et al*, 1999). Todo ello conlleva un aumento de la progresión de la placa, reduciendo la luz del vaso, y comprometiendo la circulación y el flujo coronario del miocardio dependiente de dicha arteria (Badimón L *et al*, 2001).

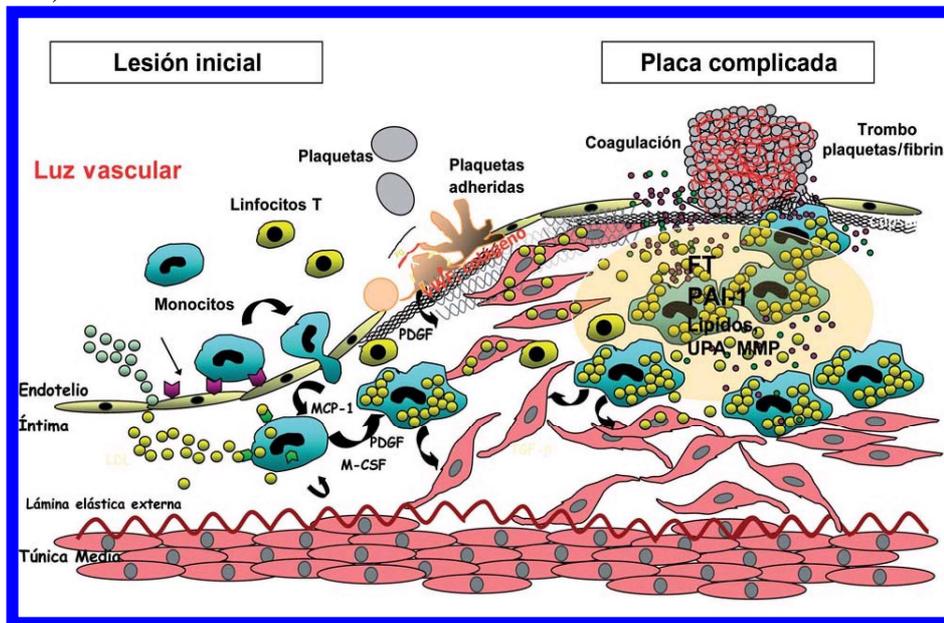


FIGURA 1.3.2. Progresión de la placa aterosclerótica. (Modificado de <http://enciclopedia.us.es/images/5/59/Aterosclerosis1.jpg&imgrefurl>).

Finalmente, se induce la apoptosis de las células musculares lisas, alterándose el balance entre síntesis y degradación de la matriz en las zonas con inflamación activa de las placas ateroscleróticas, pudiendo producirse su fisura en cualquier momento. Al romperse se liberan sustancias muy tóxicas, como los radicales libres, que continúan el círculo vicioso. Además, la lesión endotelial resultante favorece la exposición del colágeno subendotelial a la luz vascular, con el consiguiente aumento de la adhesión y la activación plaquetaria, produciéndose la activación de la hemostasia primaria y secundaria. Mientras que la oclusión

parcial o total del vaso condiciona la presentación clínica del síndrome coronario agudo (angina inestable, infarto sin onda Q, infarto con onda Q).

1.3.3. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR, INFLAMACIÓN Y COAGULACIÓN. IMPLICACIÓN DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C EN LA ENFERMEDAD CARDÍACA

Desde la aceptación de la existencia de una conexión entre la enfermedad cardiovascular y la trombosis (DeWood M *et al*, 1980), se sospechó que la concentración de componentes de la coagulación debería estar asociada con el riesgo de síndromes coronarios agudos, tales como infarto de miocardio. Por otro lado, se han investigado los diferentes mecanismos fisiopatológicos y anatomopatológicos que explican la aterotrombosis, así como los fenómenos inflamatorios, coagulantes, y fibrinolíticos asociados a la formación de la placa y que se traducen clínicamente como síndrome coronario agudo. Así, múltiples evidencias demostraron que la inflamación está implicada en todas las etapas y procesos de la enfermedad cardiovascular (Ross R *et al*, 1993; Van der Wal AC *et al*, 1994; Tracy RP *et al*, 1999). De forma que, los diferentes mecanismos antiinflamatorios podrían jugar un papel crucial en la protección frente al infarto de miocardio. Por otra parte, la inflamación y la coagulación sanguínea son reacciones en cadena en las que intervienen un gran número de proteínas, formando un círculo vicioso en el que la inflamación estimula la coagulación y ésta a la inflamación sucesivamente, debiendo existir diferentes mecanismos fisiológicos, tanto anticoagulantes como antiinflamatorios, que sean capaces de regular ambos procesos simultáneamente. La activación celular juega un papel central en la iniciación y propagación de la inflamación y coagulación sanguínea, y constituye el nexo de unión entre ambos procesos y el daño vascular.

El sistema de la PC se ha revelado como uno de los mecanismos capaces de controlar la propagación de la inflamación y la coagulación sanguínea, al exhibir funciones tanto anticoagulantes como profibrinolíticas para el mantenimiento del equilibrio hemostático, anti-inflamatorias, neuroprotectoras y anti-apoptóticas, como se ha descrito anteriormente, y aunque no está muy clara su implicación en la patogénesis de la trombosis arterial, se le sugiere un papel protector. En diferentes estudios, se ha visto que la APC reduce el daño órgano-específico en modelos animales con sepsis, daño isquémico, daño endotelial y *Stroke* (Iwaki T *et al*, 2005; Pereira C *et al*, 2008; Bernard GR *et al*, 2001a & 2001b; Esmon CT, 2002; Folsom AR *et al*, 1999; Mosnier LO *et al*, 2007b). Por otra parte, se ha observado que las arterias enfermas expresan menos EPCR y TM en su superficie, efecto de la acción

combinada de elevados niveles de LDL y reducidos de HDL (Griffin JH *et al*, 1999), así como por el propio crecimiento de la placa de ateroma (Laszik ZG *et al*, 2001).

En un estudio previo de nuestro grupo (España F *et al*, 2002b; Zorio E *et al*, 2006b) se demostró la asociación entre los niveles de APC, el riesgo de infarto de miocardio y el grado de afectación coronaria en pacientes jóvenes con infarto de miocardio, en los que la presencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos son menos frecuentes. Así, se observó una menor concentración de APC circulante en pacientes con infarto de miocardio a edad temprana comparado con controles sanos. Estas diferencias suponían un incremento de la OR del 60% por cada disminución de 0,43 ng/ml de APC. Además, la afección de las arterias coronarias, así como la severidad de las lesiones coronarias, estaban inversamente correlacionadas con los niveles de APC, de forma que a menores niveles de APC la afección y severidad de las lesiones era mayor. De forma que existe una relación entre niveles reducidos de APC circulante, situación pro-inflamatoria mantenida y desarrollo precoz de aterotrombosis, que contribuye a un aumento del riesgo de infarto de miocardio. Este efecto se vería acentuado además, por la propia inflamación, capaz de disminuir la acción antitrombótica de la APC, vía activación del complemento y aumento de la concentración del fragmento C4b-BP (Boerger LM *et al*, 1987; Gilabert J *et al*, 1988), y vía el aumento de los niveles de fibrinógeno (Díez N *et al*, 2006). Además, se ha demostrado la existencia de auto-anticuerpos contra el EPCR, que podrían modular la activación de APC, asociados a infarto de miocardio en mujeres jóvenes (Montes R *et al*, 2005).

Por otra parte, diversos estudios han sugerido la asociación entre mutaciones en el gen de la TM (Ireland H *et al*, 1997) y el EPCR (Biguzzi E *et al*, 2001; Ireland H *et al*, 2005) con la trombosis arterial. En este sentido, alteraciones funcionales ya en las proteínas directamente necesarias o en aquellas relacionadas para la activación del sistema de la PC, podrían explicar la disminución en la generación de APC y el infarto de miocardio.

1.4. - ENFERMEDAD DE BEHÇET

1.4.1. DESCRIPCIÓN

La enfermedad de Behçet, descrita en 1937 por el Dr. Hulusi Behçet, se define como un desorden inflamatorio raro con curso crónico y origen desconocido que afecta a los vasos sanguíneos, produciendo una vasculitis sistémica recurrente en venas, arterias y capilares sanguíneos, caracteriza por la presencia de aftas orales y genitales, uveítis y lesiones cutáneas. Afecta a diferentes órganos simultánea o consecutivamente y produce una respuesta autoinmune, dando un pronóstico más o menos grave en función del sistema afectado. Aparece en individuos de entre 30 y 40 años (Benamour S *et al*, 1999), expuestos a algún agente externo medioambiental, probablemente una bacteria, y genéticamente predispuestos, siendo infrecuente en niños e individuos de más de 50 años. Varios autores han descrito que los pacientes en quienes la enfermedad se manifiesta a edades más tempranas desarrollan cuadros más graves (Sakane T *et al*, 1999; Pipitone N *et al*, 2004). Afecta a ambos géneros en general, aunque en hombres jóvenes aparecen los síntomas más severos, con afecciones oculares, vasculares y neurológicas, de mayor mortalidad (Yazici H *et al*, 1984).

Se diagnostica de acuerdo al criterio definido por el Grupo Internacional de Estudio de la Enfermedad de Behçet, (*Criteria for diagnosis of Behçet's disease. International Study Group for Behçet's Disease*, 1990) según la presencia de ulceraciones orales y genitales recurrentes, inflamación ocular y lesiones cutáneas. Otras manifestaciones que pueden desarrollar estos pacientes son: inflamación en articulaciones, artralgiás o artritis, inflamación intestinal, inflamación del sistema nervioso tanto a nivel central como periférico, afectación audiovestibular, pulmonar, hepática o cardíaca, tromboflebitis subcutáneas, trombosis venosa o arterial y/o aneurismas (Yazici H *et al*, 1998).

Aunque tiene una amplia distribución geográfica, aparece con más frecuencia desde el este de Asia hasta los países del este del mar Mediterráneo, a lo largo de la llamada Ruta de la Seda, siendo infrecuente en el Centro y Norte Europeo. Turquía tiene la prevalencia más elevada, seguida por Japón, Irán, Arabia Saudita, China y Corea. En España la frecuencia se cifra entre 5,6 y 6,4 casos por 100.000 habitantes (Graña J *et al*, 2001; González-Gay MA *et al*, 2000; Eiroa P *et al*, 1991).

1.4.2. COAGULACIÓN, INFLAMACIÓN Y ENFERMEDAD DE BEHÇET

Los pacientes con Behçet presentan un estado procoagulante (Kiraz S *et al*, 2002) asociado a la inflamación y el daño en el endotelio vascular que acompaña a la enfermedad, y que produce además una elevada generación de trombina y una menor fibrinólisis. Así, los pacientes con Behçet se caracterizan por la presencia de niveles reducidos de tPA y TM circulante, y niveles elevados de PAI-1, complejo plasmina: α_2 -antiplasmina, factor Von Willebrand, fragmentos 1+2 de la PT (F1+2), y complejo trombina:AT. (Aitchison R *et al*, 1989; Hamton KK *et al*, 1991; Orem A *et al*, 1995b; Haznedaroglu IC *et al*, 1996b & 1996c ; Demirer S *et al*, 2000; Espinosa G *et al*, 2002a & 2002b; Donmez A *et al*, 2005; Yurdakul S *et al*, 2005; Ricart JM *et al*, 2005a & 2006c & 2008).

Entre el 25 y 30% de los pacientes con Behçet sufren trombosis, siendo el VTE más frecuente que la trombosis arterial. Sin embargo, el mecanismo que explica la formación del trombo en la enfermedad de Behçet todavía es desconocido, debiendo contribuir otros factores ambientales y hereditarios, puesto que aunque las alteraciones producto de la inflamación y daño endotelial son un factor de riesgo trombótico, no son suficientes para explicarlo, ya que otras enfermedades ligadas a vasculitis no causan trombosis, y no todos los pacientes con Behçet la sufren (Lie JT *et al*, 1992; Espinosa G *et al*, 2002b).

Algunos estudios apuntan a la presencia de factores de riesgo trombofílicos hereditarios, tales como deficiencias en PC (Mohri M *et al*, 1997b; Bayraktar Y *et al*, 1998), PS (Chafa O *et al*, 1992 ; Guermazi S *et al*, 1997; Lenk N *et al*, 1998) o AT (Nalçaci M *et al*, 1998; Mader R *et al*, 1999; Sengül N *et al*, 2000), presencia de anticuerpos antifosfolipídicos o las mutaciones factor V Leiden (Gül A *et al*, 1996; Mammo L *et al*, 1997; Oner AF *et al*, 1998), protrombina 20210A (Gül A *et al*, 1999; Salvarani C *et al*, 2000; Vayá V *et al*, 2000b; Gurgey A *et al*, 2003; Ateş *et al*, 2003; Sihigardi *et al*, 2004; Ricart JM *et al*, 2006c), o C677T en el gen de la enzima MTHFR (Toydemir PB *et al*, 2000; Espinosa G *et al*, 2002b; Ricart JM *et al*, 2006c) como causantes del mayor riesgo protrombótico en pacientes con la enfermedad de Behçet. También se han asociado la presencia de diferentes factores de riesgo trombofílicos adquiridos, como anticuerpos anticardiolipina (Hull RG *et al*, 1984), lupus anticoagulante (Bang D *et al*, 1991), niveles elevados de lipoproteína A (Orem A *et al*, 1995b, Gürbüz O *et al*, 2001), o hiperhomocisteinemia (Altınbaş A *et al*, 2000; *Journal of Internal Medicine*, 2000; Lee L *et al*, 2002; Korkmaz C *et al*, 2002; Calikoglu E *et al*, 2002; Sarican T *et al*,

2007; Gönül M *et al*, 2009), como posible explicación de este estado procoagulante, aunque los resultados son contradictorios. Además se ha descrito la asociación entre dislipemia y la mayor tendencia trombótica en pacientes con la enfermedad de Behçet (Leiba M *et al*, 2004).

1.4.3. IMPLICACIÓN DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C EN LA ENFERMEDAD DE BEHÇET

Nuestro grupo, previamente, describió que niveles reducidos de APC son un factor de riesgo de VTE (España F *et al*, 2001). Así, se planteó el estudio de si niveles reducidos de APC suponían también un factor de riesgo trombótico para la enfermedad de Behçet, midiendo los niveles de APC en un grupo de pacientes con la enfermedad de Behçet con y sin historia de trombosis, y en un grupo control (Navarro S *et al*, 2004). Los resultados mostraron que los niveles de APC estaban significativamente reducidos en la enfermedad de Behçet, y dentro de los pacientes en los que habían sufrido un evento trombótico. Además, aquellos pacientes con la enfermedad de Behçet que tienen niveles de APC por debajo de 0,75 ng/ml (valor correspondientes al percentil 10% del grupo control) tienen 7 veces más riesgo de sufrir un VTE que los pacientes con niveles de APC por encima de este nivel. No se observaron diferencias en los niveles plasmáticos de los inhibidores plasmáticos de la APC, ni para el complejo APC:PCI, o en los niveles de α_1 -AT entre pacientes con Behçet y controles, que pudieran hacer pensar que la reducción en los niveles de APC se debieran al efecto de los inhibidores plasmáticos de la PC. Así, la reducción en los niveles de APC observada en estos pacientes podría explicar la mayor incidencia de VTE.

También en este estudio (Navarro S *et al*, 2004), se observó que los pacientes con la enfermedad de Behçet tenían niveles reducidos de sTM. Estos niveles reducidos de sTM podrían reflejar niveles reducidos de TM en la membrana celular, que produciría una menor activación de la proteína C, y con ello niveles plasmáticos reducidos de APC. Además, observamos que en el grupo de pacientes existía una correlación positiva entre los niveles de APC y de sTM ($r=0,456$; $P=0,004$). Por otra parte, diferentes estudios han observado que mediadores proinflamatorios suprimen la expresión endotelial de TM, y con ello los niveles plasmáticos de sTM (Moore K *et al* L, 1987; Archipoff *et al*, 1991). En nuestro estudio se observaron niveles aumentados de CRP, α_1 -AT, fibrinógeno y factor Von Willebrand, producto de la inflamación crónica que acompaña a la enfermedad de Behçet, además de una correlación positiva entre APC y TM,

apoyando la hipótesis de una modulación debida a componentes asociados con la enfermedad, tales como endotoxina, interleukina-1 o TNF- α , que inducen una regulación negativa de la expresión de TM y menores niveles de APC (Moore KL *et al*, 1987; Conway EM *et al*, 1988). Otra posibilidad es la asociación entre una menor expresión de TM y mutaciones en el gen de la TM (Norlund L *et al*, 1997a & 1997b; Ohlin AK *et al*, 1997; Le Flem L *et al*, 1999 & 2001).

Además, existen estudios que apuntan la existencia de causas genéticas ligadas a la enfermedad de Behçet, como las mutaciones en los locus A, B, C y D del antígeno de histocompatibilidad HLA clase I y clase II, destacando el alelo HLA-B51, o en los transportadores de antígenos del citosol al retículo endoplásmico a través de los transportadores de péptidos antigénicos TAP-1 y TAP-2 (González-Escribano *et al*, 1995), aunque se desconoce si son causas directas de la enfermedad, o se asocian a esta enfermedad a través de un desequilibrio de unión con otra mutación en otro gen dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Además, existen diferentes estudios acerca de la implicación genética de mutaciones en el gen del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), o mutaciones en genes de moléculas de adhesión intracelular, o en el gen del factor regulador de interferón clase I y II (Lee L, 2007), o presencia de agentes infecciosos, como bacterias tipo *Streptococcus* o el virus Herpes simple tipo I, que pueden tener un efecto sobre la enfermedad, actuando como el primer estímulo desencadenante del daño endotelial, inflamación y vasculitis.

Puesto que la etiología de la trombosis en la enfermedad de Behçet resulta desconocida, y resultados previos descritos por nuestro grupo mostraron que el sistema anticoagulante de la proteína C influye en el desarrollo del evento trombótico en pacientes con dicha enfermedad, constituyendo un factor de riesgo trombótico, nos planteamos identificar si esta mayor predisposición trombótica tiene un componente genético. Dado que observamos un nivel reducido de APC en los pacientes con enfermedad de Behçet, y puesto que estos niveles pueden estar influenciados por haplotipos en el gen del EPCR, analizamos la asociación entre los haplotipos A1 y A3 del gen del EPCR, los niveles plasmáticos de APC y sTM, y el riesgo de VTE.

2. – HIPÓTESIS DE TRABAJO **Y OBJETIVOS**

*“El que quiere interesar a los demás, tiene que provocarlos”.
(Salvador Dalí)*

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La vía de activación de la proteína C (PC), compuesta por el complejo cuaternario trombina-TM-EPCR-PC, podría definirse como una de las vías capaces de mantener la homeostasis bajo condiciones de hipercoagulabilidad y/o en condiciones de estrés proinflamatorio. Sin embargo, todavía se desconocen muchos de los mecanismos fisiopatológicos responsables de los desórdenes hemostáticos, así como los defectos genéticos causantes. Tal como se ha indicado en la introducción, en los últimos años, diferentes estudios han puesto en evidencia que alteraciones asociadas con el sistema de la PC están asociadas con la enfermedad tromboembólica. Nuestro grupo ha demostrado la implicación del sistema de la PC en diferentes situaciones clínicas, y ha descrito la existencia de mutaciones en los genes que codifican para las proteínas de este sistema, demostrando la asociación entre estas mutaciones, los niveles plasmáticos de las proteínas para las que codifican, y el riesgo trombótico.

Por todo ello, nos planteamos la hipótesis que alteraciones genéticas en el sistema de la PC podrían influir sobre el riesgo trombótico, tanto venoso como arterial, y que además, deben existir otros componentes celulares o en circulación que modulen dicho riesgo.

En la presente Tesis Doctoral nos planteamos la hipótesis que alteraciones genéticas en el sistema de la PC podrían influir sobre el riesgo trombótico tiene como objetivo caracterizar las principales mutaciones del sistema de la PC, previamente identificadas y estudiadas por nuestro grupo, con la finalidad de conocer cómo modifican el riesgo trombótico en individuos que ya tienen un factor de riesgo trombótico conocido, como son los individuos portadores de la mutación protrombina 20210A, así como conocer cómo modifican el riesgo trombótico en enfermedades con una importante implicación inflamatoria, como son el infarto de miocardio o la enfermedad de Behçet, y que por tanto pondrían de manifiesto las actividades antiinflamatorias y citoprotectoras recientemente descritas para el sistema de la PC. Por otra parte, en presencia de una misma mutación el fenotipo varía entre individuos y poblaciones. Así, deben existir moduladores tanto exógenos como endógenos que influyen en las diferentes rutas hemostáticas. Diferentes estudios han puesto de manifiesto que el sistema de la PC es modulado por los componentes de la membrana

celular, destacando fosfolípidos, lípidos y glicolípidos. Así, nos planteamos el estudio del glicolípido neutro glucosilceramida (GlcCer), así como del gen que codifica para el enzima que se encarga de la síntesis de la GlcCer, la glucosilceramida sintasa.

2.2. OBJETIVOS

Para ello nos propusimos la consecución de los siguientes objetivos:

- 1.** Evaluar la influencia de los haplotipos A1 y A3 del gen del receptor endotelial de la proteína C (EPCR), sobre el riesgo de tromboembolismo venoso (VTE) en pacientes portadores de la mutación 20210A del gen de la protrombina.
- 2.** Estudiar la asociación entre el polimorfismo C1418T del gen de la trombomodulina (TM) y los niveles plasmáticos de TM soluble (sTM) y de proteína C activada (APC), y el riesgo de VTE.
- 3.** Identificar mutaciones en el gen que codifica para la glucosilceramida (GlcCer) sintasa, la enzima que cataliza la síntesis de GlcCer, y establecer su asociación con los niveles plasmáticos de GlcCer y con el riesgo de VTE.
- 4.** Estudiar la asociación entre las mutaciones identificadas en los genes que codifican para una de las proteínas del complejo de activación de la proteína C, el EPCR, los niveles de APC y sTM, y el riesgo de infarto de miocardio.
- 5.** Evaluar cómo influyen los haplotipos A1 y A3 del gen del EPCR sobre el riesgo de VTE en la enfermedad de Behçet.

3. – MATERIAL Y MÉTODOS

*“Todo es muy difícil antes de ser sencillo”.
(Thomas Fuller)*

3.1. - GRUPOS CLÍNICOS

Todos los pacientes y controles estudiados en la presente Tesis Doctoral dieron su consentimiento informado previo a la toma de muestras. Además, todos los estudios fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital y la investigación fue llevada a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki.

Los diferentes grupos de estudio establecidos para la consecución de los objetivos que se plantean en la presente Tesis Doctoral, según la patología de estudio, son:

3.1.1. TROMBOSIS VENOSA

El diagnóstico del episodio trombótico en los miembros inferiores y/o embolismo pulmonar, también denominado VTE, fue realizado mediante probabilidad clínica, niveles de dímero D, ultrasonografía o venografía, *screening* pulmonar por ventilación-perfusión y, cuando fue necesario, por flebografía o angiografía pulmonar.

El estudio de trombofilia se realiza en pacientes que han sufrido un evento trombótico a una edad inferior a los 50 años, o presentan trombosis recurrente, o tienen una historia de trombosis familiar positiva, o la trombosis tiene una localización inusual, o bien se trata de una trombosis considerada como idiopática (desarrollada en ausencia de cualquier factor de riesgo precipitante: uso de anticonceptivos orales, cirugía, embarazo o puerperio, traumatismo o inmovilización).

Excluimos del estudio todos aquellos individuos que estaban en tratamiento con anticoagulantes orales y aquellos pacientes que presentaban alguna de las siguientes patologías: cáncer, síndrome nefrótico, disfunción renal o hepática, enfermedades inflamatorias o infecciosas, fallo cardíaco o lupus anticoagulante. También se excluyeron aquellas mujeres en tratamiento con anticonceptivos orales o terapia hormonal sustitutiva.

3.1.1.1. ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS EN EL GEN DEL EPCR SOBRE EL RIESGO DE VTE, EN SUJETOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN 20210A DEL GEN DE LA PROTROMBINA

En los registros del Hospital Universitario La Fe de Valencia identificamos 125 pacientes caucásicos que habían sufrido, al menos, un VTE, portadores de la mutación 20210A en el gen de la protrombina (PT), no relacionados entre sí y que fueron referidos al hospital para un estudio de trombofilia entre 1996 y 2006.

De los 125 pacientes identificados como portadores de la mutación 20210A del gen de la PT, 7 fallecieron antes del estudio, 13 no pudieron ser localizados, 12 no aceptaron participar en el estudio y en 9 el estudio familiar no fue posible. Por lo tanto, 84 propósitos participaron finalmente en el estudio (47 mujeres y 37 hombres). La edad media del primer evento trombótico fue 40 años (mujeres 37 años; hombres 44 años).

En total, los 84 propósitos tenían 405 familiares de primer grado todavía vivos, de los cuales 302 dieron su consentimiento informado y participaron en el estudio. Los familiares menores de 16 años fueron excluidos del estudio. Un total de 162 familiares fueron identificados como portadores de la mutación en el gen de la protrombina (93 mujeres y 69 hombres), entre los cuales 13 habían experimentado un evento trombótico (6 mujeres y 7 hombres). De los 140 familiares restantes sin la mutación (64 mujeres con una edad media de 42 años y 76 hombres con una edad media de 44 años), 2 habían sufrido un evento trombótico (uno afecto de una deficiencia de PC y el otro portador de la mutación FV Leiden).

De todos ellos se obtuvo una muestra de sangre para el estudio genético, y otra de sangre anticoagulada con citrato, para la obtención de plasma con el cual realizar las determinaciones de diversos parámetros plasmáticos.

3.1.1.2. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO C1418T DEL GEN DE LA TROMBOMODULINA, LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE TROMBOMODULINA SOLUBLE Y LOS DE PROTEÍNA C ACTIVADA CON EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO

Los sujetos que participaron en este estudio procedían de 3 hospitales Españoles: Hospital Universitario La Fe de Valencia, Hospital General Universitario J.M. Morales Meseguer de Murcia y Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

El grupo de pacientes estaba formado por 1.173 individuos (613 hombres y 560 mujeres) caucásicos que habían sufrido, al menos, un episodio de VTE. La edad media era de 46 años (hombres 48 años y mujeres 44 años).

El grupo control estaba formado por 1.311 individuos (705 hombres y 606 mujeres) voluntarios no relacionados entre sí, con una distribución de edad y sexo similar al grupo de pacientes (edad media 44 años; hombres 46 años y mujeres 44 años), y de la misma región geográfica que éstos. Todos ellos estaban aparentemente sanos y ninguno presentaba historia personal o familiar de trombosis. Este grupo fue reclutado paralelamente a la inclusión de pacientes, entre el personal sanitario de los tres hospitales mencionados, familiares o amigos de éstos, o entre individuos que iban a someterse a pruebas pre-operatorias para intervenciones de cirugía menor de oftalmología, otorrinolaringología, dermatología o traumatología.

De todos ellos se obtuvo una muestra de sangre para el estudio genético, y de un subgrupo de 366 pacientes con historia de VTE y sin terapia cumarínica, y en un subgrupo de 451 sujetos sanos, procedentes todos ellos del Hospital Universitario La Fe, fue posible obtener sangre anticoagulada con citrato, para la obtención de plasma con el cual realizar las determinaciones de diversos parámetros plasmáticos.

3.1.1.2.1. Análisis funcional del polimorfismo C1418T del gen de la trombomodulina: aislamiento, cultivo y genotipado de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs)

Puesto que las células endoteliales de la pared vascular sintetizan y exponen trombomodulina (TM) en su superficie, aislamos y cultivamos células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) con el fin de analizar la funcionalidad del polimorfismo C1418T del gen de la TM. Para ello, genotipamos las células para el polimorfismo C1418T, y cuantificamos los niveles de TM tanto en el sobrenadante de los cultivos, que equivaldría a la TM soluble (sTM) presente en la circulación sin actividad cofactora para la activación de la proteína C, como en el extracto celular, que equivaldría a la TM anclada en la membrana de la célula, encargada de la unión a trombina, y responsable de la activación de la proteína C in vivo.

Las HUVECs se aislaron de cordones umbilicales humanos de acuerdo con la técnica descrita por Martínez-Sales y colaboradores (2007). Brevemente, las HUVECs se obtuvieron por digestión con colagenasa y posterior cultivo en frascos T-25 recubiertos con factor de adhesión endotelial (*Endothelial Cell Attachment Factor*. Sigma-Aldrich Co, Alemania), en medio 199 con HEPES 15 mM, suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 20%, factor de crecimiento endotelial al 1%, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, penicilina 50 U/ml, y 50 µg/ml de sulfato de estreptomina en una atmósfera de 95% aire-5% CO₂. Los subcultivos se obtuvieron a partir de monocapas confluentes del cultivo primario, tratadas con tripsina 0,25% y EDTA 0,01% en tampón fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 (PBS). Todas las experiencias se realizaron en el primer o segundo subcultivo.

Las células se identificaron como endoteliales por su típica forma de canto rodado y por la presencia de factor von Willebrand, confirmada por un método inmunocitoquímico utilizando anticuerpos anti-von Willebrand humano de conejo (Dako, Alemania).

Así, a partir de un cultivo primario de HUVECs, se recogieron entre 600.000 y 1.000.000 células para el estudio de biología molecular que, tras su lavado y almacén en nitrógeno líquido, se guardan hasta el momento de su análisis. La extracción de DNA genómico para el genotipado de las células para el polimorfismo C1418T del gen de la TM, se realizó empleando el kit comercial Wizard Genomics DNA Purification Kit (Promega, Innogenetics), siguiendo las

indicaciones del fabricante. El resto de cultivo primario se sembró en placas de 96 pocillos, con 15.000-20.000 células por pocillo, y en medio de cultivo con 20% de SBF. Cuando alcanzaron confluencia, se cambió el medio de cultivo con 2% de SBF y sin antibióticos. A continuación, de cada primer subcultivo para cada cordón se hicieron incubaciones sin y con trombina a 1 U/ml durante 3 horas por quintuplicado. Finalmente, se cuantificó por una parte, la TM presente en el sobrenadante recogido o liberado celular, y por otra parte, la TM presente en el contenido celular para cada tipo de subcultivo en condiciones basales o estimuladas con trombina, respectivamente. La obtención del contenido celular se realiza mediante incubación en agitación de 2 h a 4°C de las células endoteliales con tampón de lisis (Tris 20 mM, ClNa 100 mM, TritonX-100 al 1% y fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM; pH 7,5), obteniendo el lisado celular, al que sometemos a tres ciclos de congelación y descongelación, finalmente.

3.1.1.3. IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA GLUCOSILCERAMIDA SINTASA (UGCG), Y SU ASOCIACIÓN CON LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GlcCer, PROTEÍNA C ACTIVADA Y RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO

Para la realización de este estudio se reclutaron pacientes que habían sufrido, al menos, un episodio de VTE, a partir del registro de pacientes remitidos al Hospital Universitario La Fe para realizar un estudio de trombofilia entre octubre de 1997 y noviembre de 2005.

Un total de 316 pacientes caucásicos satisfacían todos los criterios de inclusión y accedieron a participar en el estudio (163 mujeres y 153 hombres), con una edad media de 42 años (40 años en el grupo de mujeres y 44 años en el grupo de hombres).

Los individuos del grupo control fueron reclutados junto con el grupo de pacientes entre el personal del Hospital Universitario La Fe, familiares o amigos de éstos, o entre individuos que venían a realizarse pruebas pre-operatorias para intervenciones de cirugía menor de oftalmología, otorrinolaringología, dermatología o traumatología. Este grupo estaba formado por 320 individuos caucásicos voluntarios no relacionados entre sí, de edad y sexo similar al de los pacientes (177 mujeres y 143 hombres), con una media de edad de 40 años (40 años para el grupo de hombres y 41 años para el de mujeres), y de la misma región geográfica. Todos ellos estaban aparentemente sanos y ninguno presentaba historia personal o familiar de trombosis.

De todos ellos se obtuvo una muestra de sangre para el estudio genético, y otra de sangre anticoagulada con citrato, para la obtención de plasma con el cual realizar la determinación de GlcCer y APC.

3.1.2. TROMBOSIS ARTERIAL

Los pacientes fueron diagnosticados de infarto agudo de miocardio según presentaran una curva típica de troponinas o elevados niveles de la isoenzima creatinina-cinasa específica del miocardio (CK-MB) junto, al menos, uno de los siguientes parámetros anormales: síntomas isquémicos, desarrollo de ondas Q patológicas en el electrocardiograma, cambios en el electrocardiograma indicativos de isquemia (elevación o depresión del segmento ST) o intervencionismo coronario, de acuerdo con los criterios definidos por la *European Society of Cardiology/ American College of Cardiology*.

Fueron criterios de exclusión la procedencia de áreas geográficas diferentes, los antecedentes de neoplasias, hepatopatía grave, enfermedades hematológicas, consumo de drogas, o la presencia de tratamientos anticoagulantes.

Los factores de riesgo cardiovascular se definieron según:

- Hipertensión, bien por la presencia de una historia previa, o el uso de drogas anti-hipertensivas, o haberse observado valores de una presión sanguínea $\geq 140/90$ mmHg en al menos dos observaciones separadas.
- Diabetes mellitus, bien por la presencia de una historia previa, o el uso de drogas antidiabéticas, o haberse observado valores de glucemia basal >110 mg/dl.
- Dislipemia, bien por la presencia de una historia previa, o haberse observado un valor de colesterol total >250 mg/dl y/o de triglicéridos >175 mg/dl.
- Fumadores, actuales o previos fumadores de menos de 10 años de antigüedad.
- Obesidad, índice de masa corporal (BMI) ≥ 30 kg/m².
- Síndrome metabólico, se definió por la presencia de al menos tres de los siguientes criterios: índice de masa corporal (BMI) ≥ 30 kg/m², triglicéridos >175 mg/dl, HDL-colesterol < 40 mg/dl, presión sanguínea $\geq 140/90$ mm Hg, glucosa >126 mg/dl.

3.1.2.1. ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS HAPLOTIPOS A1 Y A3 DEL GEN DEL EPCR Y DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE PROTEÍNA C ACTIVADA Y TROMBOMODULINA SOLUBLE, SOBRE EL RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO PRECOZ.

Este estudio sigue un diseño prospectivo caso-control, con la finalidad de poder identificar nuevos marcadores de riesgo que nos permitan plantear futuros estudios de cohortes más ambiciosos. Los sujetos incluidos en este estudio se reclutaron entre junio de 2000 y septiembre de 2005.

Estudiamos 689 pacientes (601 hombres con una edad media de 42 años, y 88 mujeres, con una edad media de 42 años) que habían sufrido un infarto de miocardio antes de los 51 años, procedentes de los servicios de cardiología de 3 hospitales de la región mediterránea española: Hospital Universitario La Fe de Valencia, Hospital General Universitario de Alicante, y Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

De todos ellos se obtuvo muestras de sangre para el estudio genético, y de un subgrupo de pacientes, compuesto por 260 sujetos reclutados en la Unidad de Cuidados Intensivos y en la sala de hospitalización de Cardiología del Hospital Universitario La Fe, fue posible obtener muestras de sangre anticoagulada con citrato para la obtención de plasma, con el cual realizar las determinaciones de diversos parámetros plasmáticos. Con el fin de evitar la pérdida de aquellos pacientes con peor perfil clínico, por mortalidad precoz, los pacientes procedentes de la unidad de cuidados intensivos fueron sometidos a dos extracciones sanguíneas. La primera se realizó durante las primeras 72 horas del ingreso por infarto agudo de miocardio y la muestra se destinó exclusivamente a la obtención de DNA, ya que el perfil genético no se ve alterado ni durante la fase más aguda del evento isquémico ni con el tratamiento administrado. La segunda extracción se realizó en aquellos que sobrevivieron al evento, al menos 3 meses trascurrido el episodio clínico, y en ella se completó el estudio con una bioquímica general y la cuantificación de los niveles de los parámetros elegidos para el estudio.

El grupo control, formado por 697 individuos sanos de similar distribución de edad y sexo al de los pacientes (608 hombres, mediana de edad 44 años; 88 mujeres, mediana de edad 44 años), fue reclutado paralelamente a la inclusión de pacientes, entre el personal sanitario de los tres Hospitales mencionados, familiares o amigos de éstos, o individuos que iban a realizarse pruebas pre-operatorias para

intervenciones de cirugía menor de oftalmología, otorrinolaringología, dermatología o traumatología. Todos ellos estaban aparentemente sanos y ninguno presentaba historia personal o familiar de trombosis venosa o arterial. No se incluyeron mujeres en tratamiento con terapia hormonal sustitutiva o anticonceptivos orales.

De todos ellos se obtuvo una muestra de sangre para el estudio genético, y de un subgrupo de 260 individuos sanos procedentes del Hospital Universitario de la Fe, fue posible obtener sangre anticoagulada con citrato, para la obtención de plasma con el cual realizar las determinaciones de diversos parámetros plasmáticos.

3.1.3. ENFERMEDAD DE BEHÇET

El episodio trombótico en los pacientes con Behçet fue diagnosticado siguiendo los criterios de rutina, y previamente descritos. Mediante el empleo de ultrasonografía o venografía de contraste se diagnosticó la trombosis venosa, *screening* pulmonar por ventilación-perfusión o angiografía pulmonar para el embolismo pulmonar, ecocardiografía transesofágica para la trombosis intracardíaca, y tomografía computerizada, resonancia magnética y venografía para la trombosis venosa cerebral. Así, fueron localizadas en: 7 casos en miembros inferiores, 1 caso de embolismo pulmonar más vena ilíaco-cava, 1 caso en seno cerebral, 1 caso en área intracardíaca derecha, 1 caso en miembros superiores, y 1 caso embolismo pulmonar más *stroke* isquémico. Dos de los pacientes diagnosticados de Behçet sufrieron más de un episodio trombótico, y cuatro de ellos sufrieron repetidos episodios de tromboflebitis.

Ninguno de los pacientes presentaba anticuerpos antifosfolípidos, cáncer, disfunción renal o hepática, o lupus anticoagulante. Siete de los pacientes estaban tomando corticoesteroides, 5 colchicina, y 5 ambas drogas, por otra parte, 3 tomaban ciclosporina solamente, 4 combinada con corticoesteroides y 2 con colchicina. Trece no estaban tomando ningún tratamiento. En el momento de la toma de muestras, ninguno estaba bajo tratamiento con anticoagulantes orales, y ésta se realizó al menos 6 meses después del evento trombótico.

3.1.3.1. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C EN LA ENFERMEDAD DE BEHÇET Y SU CORRELACIÓN CON EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO

Estudiamos 39 pacientes diagnosticados con la enfermedad de Behçet (19 hombres y 20 mujeres) con una edad media de 43 ± 12 años (media \pm 1DE), y rango de 16 a 74 años (percentiles 10-90). Los pacientes fueron reclutados entre 1990 y 2003 en los Hospitales General y Universitario la Fe de Valencia. El diagnóstico se realizó siguiendo los criterios del Grupo de Estudio Internacional de la enfermedad de Behçet (*International Study Group for Behçet's disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease, 1990*).

Doce de los pacientes con la enfermedad de Behçet habían sufrido al menos un episodio trombótico, y fueron remitidos al Hospital Universitario La Fe para realizar un estudio de trombofilia.

El grupo control estaba formado por 78 individuos de similar distribución de edad y sexo al de los pacientes, reclutado paralelamente a la inclusión de pacientes entre el personal sanitario del hospital, familiares o amigos de éstos, o individuos que iban a realizarse pruebas pre-operatorias para intervenciones de cirugía menor de oftalmología, otorrinolaringología, dermatología o traumatología. Todos ellos estaban aparentemente sanos y ninguno presentaba historia personal o familiar de trombosis venosa o arterial.

De todos ellos se obtuvo una muestra de sangre para el estudio genético, y otra de sangre anticoagulada con citrato, para la obtención de plasma con el cual realizar las determinaciones de diversos parámetros plasmáticos.

3.2. - MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras biológicas requeridas para los diferentes estudios que se realizaron a los pacientes y controles se obtuvieron a partir de sangre periférica, la cual fue tratada de diferente forma en función de los requerimientos de cada uno de los ensayos. Las muestras de sangre se extrajeron entre las 8 y las 10 de la mañana tras un ayuno de 12 horas, en condiciones basales y clínicamente estables, o al menos de 3 a 6 meses tras el evento agudo. El tratamiento con anticoagulantes orales había finalizado, al menos, 30 días antes del estudio. La extracción de sangre se realizó por punción de la vena cubital de forma no traumática, utilizando agujas de calibre 21, y recogida en tubos Vacutainer® siliconados (Becton Dickinson),

que contenían diferentes tipos de anticoagulantes en función de la técnica para la que estaban destinados.

3.2.1. MUESTRAS PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA

Las muestras de sangre para la extracción del DNA fueron anticoaguladas con EDTA. Tras la extracción, la sangre se guardó en pequeñas fracciones adecuadas para su posterior procesado, y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

3.2.2. MUESTRAS PARA LAS DETERMINACIONES DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Para la determinación de los niveles plasmáticos de proteína C, APC, sEPCR, TM y GlcCer, la sangre fue anticoagulada con citrato trisódico 0,129 M. Posteriormente, la sangre citratada se centrifugó a 1.500 x g durante 30 minutos a 4°C y el plasma fue alicuotado y almacenado a -80°C hasta su utilización.

3.3. - DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA COAGULACIÓN Y LÍPIDOS RELACIONADOS: técnicas inmunológicas

3.3.1. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE APC CIRCULANTE

Los niveles de APC circulante se determinaron mediante un ELISA tipo *sándwich* o de doble anticuerpo, puesto a punto por nuestro grupo (España F *et al*, 1996), con ligeras modificaciones (España F *et al*, 2001) y basado en la detección de los complejos de APC con su principal inhibidor, el PCI (España F *et al*, 1989b & 1990).

Brevemente, en un tubo con 0,5 ml de citrato trisódico (0,129 M) se extrajo 4,5 ml de sangre, e inmediatamente después de la extracción se añadió 46 µl de heparina sódica 1000 U/ml (Rovi). La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min con el fin de forzar a que toda la APC del plasma formase complejos con el PCI, puesto que en presencia de heparina, más del 95% de la APC forma complejo con el PCI (España F *et al*, 1991a & 1991c). Por lo tanto, la concentración del complejo APC:PCI en el tubo con heparina es la suma de los complejos APC:PCI ya presentes en el tubo en el momento de la extracción de la sangre, y por tanto circulantes *in vivo*, y la concentración de complejos APC:PCI formada *in vitro* en el tubo a partir de la APC circulante.

A un segundo tubo de sangre anticoagulada con citrato como el anterior, se le añadieron, inmediatamente después de la extracción, 46 µl de una mezcla de benzamidina-HCl 0,58 M (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, USA) y D-fenilalanil-L-propil-L-arginina clorometil cetona (PPACK) dihidroclorídrico 0,5 M (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) con el fin de inhibir la APC presente en el tubo en el momento de la extracción o APC circulante, e impedir que formase complejos con el PCI. Así, la concentración de complejos APC:PCI en este tubo es igual a la circulante *in vivo*. Por tanto, la concentración de APC circulante se calculó a partir de la diferencia en la concentración de APC:PCI en los dos tubos.

El ensayo de ELISA *sándwich* para la cuantificación de los complejos APC:PCI en ambos tubos, utiliza como anticuerpo de captura el anticuerpo monoclonal anti-PC (C3) a 7 mg/ml. Las muestras de plasma a valorar se analizaron por duplicado a una dilución 1/6. La curva de calibración se preparó utilizando diluciones seriadas de una preparación de complejos APC:PCI purificados de concentración conocida, y que contenían 8,5, 4,25, 2,13, 1,06, 0,53, 0,27 y 0 ng/ml. Como anticuerpo de detección se utilizó un anticuerpo policlonal anti-PCI conjugado con peroxidada. El desarrollo de color se produjo tras la adición de solución de revelado (citrato sódico 0,1M + fosfato sódico 0,2 M; pH 5,0) que contenía 0,4 µl/ml de H₂O₂ al 30% y 0,4 mg/ml de O-fenilendiamina (OPD), deteniéndose la reacción transcurridos 30 minutos mediante la adición de H₂SO₄ 4 M. La lectura de la placa se realizó a 492 nm en un espectrofluorímetro MRX^{TC} Revelation (Thermo Labsystems).

Los valores de APC se expresaron en ng/ml. El límite de detección del ensayo de APC era de 0,1 ng/ml. La variación intra- e interensayo fue inferior al 6% y al 11%, respectivamente.

3.3.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES ANTIGÉNICOS DE PC

Los niveles de proteína C antigénica se determinaron mediante un ensayo ELISA tipo *sándwich*, diseñado previamente por nuestro grupo (Hendl S *et al*, 1991). Brevemente, como anticuerpo de captura se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-PC (C3) a 50 µg/ml. Las muestras de plasma a valorar se analizaron por duplicado a dilución 1/200, y la curva de calibración se preparó utilizando diluciones seriadas de 1/100 a 1/3200 a partir de una mezcla de 28 plasmas de donantes sanos, a cuya concentración de PC se le asignó el valor del 100%. Como anticuerpo de detección se utilizó la fracción IgG de un anticuerpo policlonal anti-PC conjugado con peroxidasa. El desarrollo de color se produjo tras

la adición de solución de revelado (citrato sódico 0,1 M + fosfato sódico 0,2 M; pH 5,0) que contenía 0,4 µl/ml de H₂O₂ al 30% y 0,4 mg/ml de OPD, deteniéndose la reacción transcurridos 25 minutos mediante la adición de H₂SO₄ 4 M. La lectura de la placa se realizó a 492 nm en un espectrofluorímetro MRX^{TC} Revelation (Thermo Labsystems).

Los niveles de proteína C antigénica se expresaron como porcentaje del valor de la proteína C antigénica presente en la mezcla de 28 plasmas de donantes sanos. El límite de detección del ensayo era del 2%. La variación intra- e interensayo fue del 6% y 9%, respectivamente.

3.3.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EPCR SOLUBLE

Los niveles de sEPCR se determinaron mediante un ensayo ELISA tipo *sándwich* comercial (Asserachrom® sEPCR, Diagnostica Stago, Asnières, Francia). Brevemente, a las placas recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-EPCR humano se añadió 200 µl/pocillo de las muestras de plasma obtenidas a partir de sangre anticoagulada con citrato, diluidas a 1/51 y por duplicado, y de diluciones seriadas de calibrador a $1/1$; $1/2$; $1/4$; $1/8$ y $1/16$, dejando incubar 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar la placa 5 veces con tampón de lavado, se añadió 200 µl/pocillo de anticuerpo secundario anti-EPCR humano conjugado con peroxidasa y se incubó otra hora a temperatura ambiente. Tras 5 lavados, se añadió 200 µl/pocillo de sustrato de peroxidasa y se dejó seguir la reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo del color. La reacción se detuvo con 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 M. Transcurridos 15 minutos de estabilización, la placa se leyó a una longitud de onda de 450 nm en un lector de ELISAMRX^{TC} Revelation (Thermo Labsystems).

La concentración de sEPCR en cada muestra se determinó a partir de la interpolación de los valores medios de absorbancia para cada muestra en la curva de calibración multiplicando el valor obtenido por 51, correspondiente al factor de dilución para cada muestra. Los valores de sEPCR se expresaron en ng/ml. El límite de detección del ensayo de sEPCR fue de 10 ng/ml. Las variaciones intra- e inter-ensayo fueron inferiores al 5% y 7%, respectivamente.

3.3.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TROMBOMODULINA

Los niveles de TM se determinaron mediante un ensayo ELISA tipo *sándwich* comercial (IMUBIND® Thrombomodulin ELISA kit, American

Diagnostica, Stamford, CT, USA). Este kit permite la cuantificación de TM en plasma humano, suero y cultivos celulares, ya para la forma completa, truncada (sTM) o acomplejada con la TM. Brevemente, a las placas recubiertas con un anticuerpo primario monoclonal que reconoce los dominios EGF₁-EGF₂ de la TM, se añadió 200 µl/pocillo de las muestras de plasma, obtenidas a partir de sangre anticoagulada con citrato, diluidas a 1/4 y por duplicado, y diluciones seriadas del calibrador a 1/1; 1/2; 1/4; 1/8 y 1/16, dejando incubar 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar la placa 4 veces con tampón de lavado, se añadió 200 µl/pocillo de anticuerpo monoclonal de detección o secundario conjugado con peroxidasa, y que reconoce los dominios EGF₅-EGF₆ de la TM. Se deja incubar otra hora a temperatura ambiente. Tras 4 lavados con tampón de lavado, se añadió 200 µl/pocillo del sustrato para la peroxidasa perborato/3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y se dejó seguir la reacción a temperatura ambiente durante 20 minutos para el desarrollo del color. La reacción se detuvo con 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 0,5 M. La placa se leyó a una longitud de onda de 450 nm en un lector de ELISAMRX^{TC} Revelation (Thermo LabSystems).

La concentración de TM en cada muestra se determinó a partir de la interpolación de los valores medios de absorbancia para cada muestra en la curva de calibración, multiplicando el valor obtenido por 4, correspondiente al factor de dilución para cada muestra. Los valores de TM se expresaron en ng/ml. El límite de detección del ensayo fue de 0,300 ng/ml. Las variaciones intra- e inter-ensayo fueron inferiores al 4,5% y 5,8%, respectivamente.

3.3.5. DETERMINACIÓN DEL NIVEL ANTIGÉNICO DE PROTROMBINA

El nivel antigénico de PT (PTag) se determinó mediante un ensayo ELISA tipo *sándwich*. Brevemente, como anticuerpo de captura se utilizó el anticuerpo policlonal anti-PT humano (Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN, USA) a 0,01 mg/ml. Las muestras de plasma a valorar se analizaron a dilución 1/10.000 y 1/20.000, y la curva de calibración se preparó utilizando una mezcla de 40 plasmas de donantes sanos a diluciones seriadas de 1/5000; 1/10000; 1/20000; 1/40000; 1/80000 y 1/160000. Como anticuerpo de detección se utilizó un anticuerpo policlonal anti-PT humano (Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN, USA) conjugado con peroxidasa y diluido a 1/300. El desarrollo de color se produjo tras la adición del sustrato para la peroxidasa, OPD. Transcurridos 25 minutos la reacción se detuvo

mediante la adición de H₂SO₄ 4 M. La lectura de la placa se realizó a 492 nm en un espectrofluorímetro MRX^{TC} Revelation (Thermo Labsystems).

Los niveles de PTag se expresaron como porcentaje de la concentración de la protrombina presente en la mezcla de 40 plasmas de donantes sanos, al que se le asignó un valor del 100%. La variación intra- e interensayo fue del 4,8 a 6,5% y 6,7 a 8,9%, respectivamente.

3.3.6. DETERMINACIÓN DEL NIVEL FUNCIONAL DE PROTROMBINA

Los niveles funcionales de PT (PTact) se determinaron mediante el test automatizado del tiempo de protrombina (Instrumentation Laboratory Company) modificado, incluyendo plasma humano deficiente de FII de la coagulación.

3.3.7. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DEL FRAGMENTO 1+2 DE PROTROMBINA

Puesto que los niveles de sEPCR dependen en parte de la generación de trombina, se midieron los niveles del fragmento 1+2 (F1+2) de la PT, como estimadores de dicha generación. Los niveles de F1+2 se determinaron mediante un ELISA tipo *sándwich* comercial (Enzygnost® F1+2 micro, Dade-Behring, Marburg, Germany) en plasma obtenido a partir de sangre anticoagulada con citrato.

Brevemente, como anticuerpo de captura se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón específico del fragmento F1+2 humano. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-protrombina humana conjugado con peroxidasa. El sustrato cromogénico utilizado fue TMB, y la reacción se paró mediante la adición de H₂SO₄.

Los niveles de F1+2 se expresaron en nmol/l. El intervalo de detección del ensayo fue de 0,02 a 1,2 nmol/l, con una variación intra- e interensayo inferior al 6% y 9%, respectivamente.

3.3.8. DETERMINACIÓN DE OTROS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Los niveles de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, glucosa y triglicéridos se determinaron en el servicio de análisis clínicos de nuestro hospital

mediante técnicas enzimáticas, utilizando el Autoanalizador DAX 72 (Bayer Diagnostics Division, Tarryton, New Cork, USA).

3.3.9. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUCOSILCERAMIDA

La determinación de los niveles plasmáticos del esfingolípido neutro glucosilceramida (GlcCer) se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), utilizando un sistema de HPLC de Waters (Waters Corporation, Milford, MA), acoplado a un sistema de detección por evaporación y dispersión de la luz (*ELSD System, Sedex-55, Sedere, Vitry sur Seine, Francia*), de acuerdo con la técnica descrita por Deguchi et al (Deguchi H *et al*, 2000 & 2001).

En el sistema de HPLC-ELSD, a diferencia del análisis por HPLC convencional, la muestra es analizada mediante evaporación-nebulización, convirtiendo el eluido que circula en el sistema en una nube de micropartículas, que son cuantificadas en función de la dispersión de la luz que cada partícula genera, siguiendo la ecuación exponencial:

$$I = k \cdot m^b$$

donde *I* es la intensidad de la luz, *k* y *b* son constantes cuyo valor depende de las condiciones experimentales del ensayo (temperatura, naturaleza de la fase móvil, etc.), y *m* es la masa de las micropartículas dispersadas.

Este sistema proporciona un método universal para la separación y detección de lípidos y fosfolípidos, sean de naturaleza saturada o insaturada. Puesto que son moléculas con grupos funcionales no polares, esta separación se produce en función de su polaridad, eluyendo de menor a mayor polaridad, o de menor a mayor interacción con la fase estacionaria de la columna de HPLC, normalmente sílice. Para ello, se genera un gradiente de polaridad gracias al cual los lípidos eluyen de la columna separándose con la suficiente distancia para poder diferenciar cada tipo, y que denominamos fase móvil del sistema. Este gradiente se consigue aplicando diferentes proporciones de solventes polares (interacciones con la columna más débiles y por tanto disuelven) y no polares (interacciones con la columna más fuertes y por tanto absorben). Este mecanismo de separación de las moléculas se denomina análisis en fase reversa o absorción.

Además, la selección de los solventes debe tener en cuenta la compatibilidad entre la polaridad de los grupos funcionales que componen la muestra y la

polaridad de los solventes, a fin de crear el gradiente óptimo que permita la correcta elución de los lípidos, y su absorbancia para rayos UV, puesto que la detección de lípidos ocurre a una longitud de onda de 205 nm, que es el punto de corte o límite de absorbancia para los solventes. De ser superior a 205 nm aumenta el ruido de fondo y la línea base del cromatograma, no pudiendo diferenciar los picos para cada lípido tras el análisis.

Los solventes empleados fueron:

- SOLVENTE A (apolar): Cloroformo o CHCl_3 ,
- SOLVENTE B (polar): Metanol o MeOH ,
- SOLVENTE C (solución de lavado): mezcla compuesta por una solución con 90% Metanol + 10% Agua destilada o dH_2O + 0,1% Ácido Nítrico o HNO_3 , y
- SOLVENTE D (polar): Agua destilada o dH_2O ,

todos ellos de un grado de pureza para HPLC, ya que la sensibilidad del sistema es inversamente proporcional al ruido del solvente, determinado por sus impurezas.

Para la cuantificación de la GlcCer se empleó la columna para HPLC μ -Porasil™ (Waters Corporation, Milford, MA), acoplada a una columna de seguridad universal (Waters Corporation, Milford, MA). La μ -Porasil™ es una columna de acero rellena de sílice, de dimensiones 3,9 x 300 mm, para un tamaño de partículas de 10 μm y 125 Å de tamaño de poro.

Es importante establecer la línea base o señal de intensidad que aparece por defecto en el detector, minimizando así el error para la detección de la intensidad de cada partícula que compone la muestra, y que corresponderá con la señal obtenida para la proporción de solventes en condiciones iniciales de trabajo.

Tras la cuantificación de los lípidos que contiene cada muestra, es necesario realizar un programa de lavado de la columna, empleando solventes que eluyan cualquier partícula absorbida por la columna, quedando preparada para el análisis de una nueva muestra.

A continuación se describen con detalle las etapas del ensayo:

a) Extracción de lípidos y lipoproteínas

La extracción de los lípidos y lipoproteínas plasmáticas se realizó según la técnica descrita previamente (Deguchi H *et al*, 2000) :

- a1) Se introdujo 100 μ l de plasma citratado en un vial de vidrio de 2 ml y se añadió 200 μ l de tampón TBS. Es preferible el uso de este tampón en lugar de agua, ya que mejora la ósmosis y facilita la separación de los componentes de la muestra en las diferentes fases.
- a2) Al plasma diluido se le añadió 800 μ l de cloroformo y 400 μ l de metanol, utilizando jeringas Hamilton de aguja intercambiable con bisel y adaptador a rosca, y émbolo de teflón (Microliter 700S Syringe, Hamilton), para evitar la corrosión, disolución y contaminación del plástico de las pipetas en la muestra. El vial se cerró con un tapón de teflón (White Urea F217/ Teflon Lined Caps, 8-425, National Scientific Company), para evitar la corrosión y dilución por el cloroformo.
- a3) La mezcla se agitó durante 20-30 s y se colocó en hielo durante al menos 3 minutos.
- a4) La mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 2000 x g, formándose tres fases: fase superior o acuosa con el tampón y parte del metanol, fase intermedia o fina capa blanquecina con las proteínas precipitadas, fase inferior u orgánica, de color amarillento y mezcla de metanol, cloroformo y lípidos.
- a5) Mediante una jeringa Hamilton se recogió la fase inferior, dejando siempre un pequeño volumen para evitar la contaminación con proteínas, y se pasó a un nuevo vial de vidrio. La solución se desecó con nitrógeno gaseoso y el extracto lipídico se guardó a -70°C hasta su análisis.

b) Detección HPLC-ELSD para el análisis de la GlcCer

Las condiciones establecidas para nuestro análisis fueron:

- b1) La presión límite durante el flujo se fijó a 4000.
- b2) La desgasificación de los solventes se realizó empleando Helio gaseoso.
- b3) La temperatura para el análisis de la GlcCer la fijamos a 50°C , correspondiendo a la temperatura de la cámara de evaporación.
- b4) Como gas nebulizador empleamos nitrógeno, a una presión de 2 bares.
- b5) La velocidad e intensidad del flujo de los solventes en el sistema variaba en función de la etapa de elución, de 0,1 o 3 ml/min.
- b6) Los gradientes utilizados para la correcta elución y separación de los lípidos se generaron mezclando diferentes proporciones de cloroformo, metanol, ácido nítrico y agua. Esta proporción varía según estemos analizando la muestra o en fase de lavado de la columna, al igual que el tiempo de análisis.

- b7)** El lavado de la columna se llevó a cabo con el solvente polar dimetilsulfóxido (DMSO).
- b8)** Los diferentes programas establecidos para la cuantificación de lípidos y lavado de la columna quedan resumidos en las Tablas 3.3.9.1 y 3.3.9.2.

TABLA 3.3.9.1. PROGRAMA HPLC - ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS: extractos lipídicos plasmáticos (100 µl; 34 min).

TIEMPO (min)	FLUJO (ml/min)	SOLVENTE A (%)	SOLVENTE B (%)	SOLVENTE C (%)	SOLVENTE D (%)
0	3	88	11	0	1
2	3	88	11	0	1
10	3	0	100	0	0
15	3	0	0	100	0
20	3	88	11	0	1
26	1	88	11	0	1
30	0	0	100	0	0

TABLA 3.3.9.2. PROGRAMA HPLC - LAVADO con DMSO entre cada muestra de extractos lipídicos plasmáticos, para la limpieza de la columna (300 µl; 24 min).

TIEMPO (min)	FLUJO (ml/min)	SOLVENTE A (%)	SOLVENTE B (%)	SOLVENTE C (%)	SOLVENTE D (%)
0	3	88	11	0	1
2	3	88	11	0	1
10	3	0	100	0	0
15	3	0	0	100	0
20	3	88	11	0	1
26	1	88	11	0	1
30	0	0	100	0	0

- b9)** El volumen de inyección era de 100 µl para las muestras con el extracto de lípidos plasmáticos, y de 300 µl para el DMSO. Además, la inyección de las muestras se produjo alternando pacientes y controles, de forma que el orden quedó: control-DMSO-paciente-DMSO-control- etc... Cada 5-10 muestras inyectamos además, una muestra de extracto lipídico del *pool* de plasmas normal o control, que nos servirá de control interno.
- b10)** Las condiciones iniciales de trabajo se correspondían con una proporción de solventes: 88%A + 11%B + 0%C + 1%D, con una señal en torno a 130-140 mV, que tomamos como valor cero. Después,

fijamos la escala del cromatograma mediante el selector de la intensidad o aumento de señal para un valor de 11, que se correspondía con una línea base de 120 mV.

b11) El sistema para el almacenaje y tratamiento de los resultados empleado es el software **Millenium 32**, suministrado por Waters, que nos permitió transformar la intensidad de la señal obtenida para cada micropartícula en un cromatograma, donde obtenemos los diferentes picos correspondientes a cada lípido eluido (glicolípidos: GlcCer, Lactosilceramida o Gb4Cer; fosfolípidos: fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, PE, esfingomielina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, cardiolipina, fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico; colesterol o ácidos grasos libres).

c) Preparación de las muestras

Para al análisis de cada muestra, al vial con el extracto de lípidos plasmáticos desecados le añadimos 300 µl de cloroformo, y lo filtramos utilizando filtros de un tamaño de poro de 0,20 µm (Non-sterile 4mm MILLEX-FG Syringe Filter Unit, Millipore). Durante la filtración, la muestra pasaba a un tubo cónico de precisión de vidrio (Precision Polysyring Insert, 300UL, National Scientific Company), acoplado al vial para el análisis en el inyector automático, y tapado con discos de poliestireno para evitar la evaporación de la muestra solubilizada en cloroformo.

d) Determinación de la concentración de GlcCer en plasma

Tras el análisis y monitorización de las diferentes intensidades de las partículas que componen los extractos lipídicos de cada muestra, se obtiene un cromatograma, con diferentes picos, correspondientes a cada partícula lipídica eluida durante el análisis.

En nuestro análisis el pico correspondiente a la GlcCer apareció en torno a los 6-7 minutos de elución. La identidad de cada pico fue confirmada previamente por el grupo de Deguchi y colaboradores (2000) mediante cromatografía en capa fina (TLC) y MS, empleando GlcCer purificada. El pico correspondiente a la GlcCer se obtuvo a los 4,1 minutos (Deguchi H *et al*, 2000 & 2001; Kundu SK *et al*, 1981).

Una vez identificado el pico, y utilizando el programa **Millenium 32**, que nos permite conocer diferentes parámetros del pico seleccionado (tiempo de retención, área, porcentaje del área (%), altura del pico, y tipo de pico), se selecciona y delimita

el pico correspondiente a la GlcCer (*Figura 3.3.15.1*). Una vez conocida el área, y por interpolación en la curva de calibración, se calcula la concentración de GlcCer de cada muestra, empleando las ecuaciones:

$$Y = A \cdot X^B$$

$$\log Y = \log (A \cdot X^B) = \log A + B \cdot \log X$$

$$B \cdot \log X = \log Y - \log A$$

$$\log X = (\log Y - \log A) / B$$

donde **A** y **B** son dos constantes, cuyos valores se obtuvieron a partir del ajuste de la curva de calibración, **X** es la concentración de GlcCer (μg), e **Y** el área del pico identificado para la GlcCer. Así:

$$[\text{GlcCer } (\mu\text{g})] = 10^{[(\log \text{AREA} - \log A) / B]}$$

e) Determinación de la curva de calibración para GlcCer

Además de la cuantificación de la GlcCer, y utilizando el mismo cromatograma, es posible medir la concentración del lípido PE. Este lípido eluye entre los 12-16 minutos (*Figura 3.3.9.1*), y para su cuantificación preparamos una curva de calibración que nos permita cuantificar tanto la GlcCer como la PE. Para ello, empleamos un *pool* de plasmas control comercial (*Human Plasma Pooled Normal, GEORGE KING BIO-MEDICAL, Inc*), y GlcCer y PE purificadas, realizando todo el proceso en la cámara fría, ya que a bajas temperaturas el cloroformo no se evapora, evitando así cambios en el volumen y concentración de las muestras.

Es aconsejable determinar una curva de calibración para la GlcCer antes de iniciar el análisis, a mitad y al final del análisis de las muestras, con el fin de asegurarnos que no se han modificado las condiciones del sistema durante todo el análisis. En la determinación de las diferentes curvas de calibración, empleamos siempre la misma solución de trabajo de GlcCer y PE.

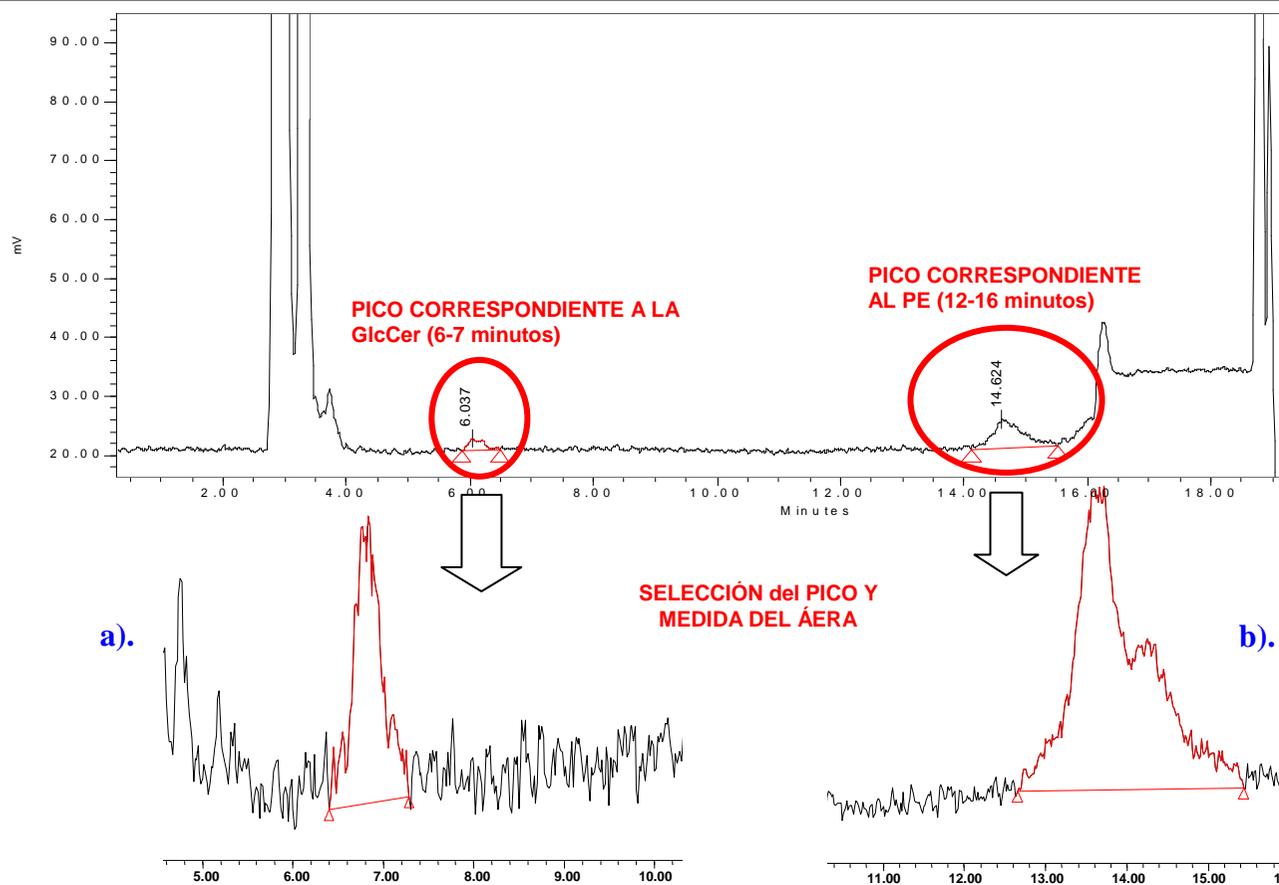


Figura 3.3.9.1. Cromatograma obtenido tras el análisis de una muestra de extracto lipídico en el sistema HPLC-ELSD. Además, en las figuras inferiores observamos el detalle de los picos eluidos para **a).** GlcCer y **b).** PE.

Los pasos a seguir fueron:

- e1) Se resuspendió 1 vial de GlcCer purificada [*GLUCO-CEREBROSIDES from Human (Gaucher's) Spleen; 1mg; SIGMA*] y otro de PE purificada [*L- α -PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE TYPE III: from Egg Yolk, Approx. 98% (TLC); 5mg; SIGMA*] en 1 ml de cloroformo, teniendo unas concentraciones finales de 1 mg/ml de GlcCer y 5 mg/ml de PE. A continuación preparamos diluciones seriadas a 1/10 con cloroformo, hasta llegar a unas concentraciones finales de GlcCer de 10 μ g/ml y PE de 50 μ g/ml.
- e2) En 1 vial de extracto lipídico de plasma control se añadió 1 ml de GlcCer a 10 μ g/ml y 1 ml de PE a 50 μ g/ml teniendo así una solución con una concentración final de 5 μ g/ml de GlcCer y 25 μ g/ml de PE, incrementando aproximadamente un 6% la concentración final debido a la concentración de GlcCer y PE propia en el *pool* de plasma control. Se repitió la operación con otro vial de extracto lipídico de plasma control, con el fin de tener cada muestra por duplicado.
- e3) La solución se pasó por filtros de 0,20 μ m y se distribuyó en 6 alícuotas de 300 μ l en tubos cónicos de precisión de vidrio. Los tubos se taparon con un disco de poliestireno para evitar la evaporación de la muestra.
- e4) Una vez preparadas las alícuotas, se inyectó en el sistema de HPLC-ELSD diferentes volúmenes de cada alícuota por duplicado, analizando así diferentes concentraciones de GlcCer (TABLA 3.3.9.3).

TABLA 3.3.9.3. Volumen de inyección y concentración de GlcCer y PE purificadas para elaborar la curva de calibración.

VOLUMEN A INYECTAR (μ l)	CONCENTRACIÓN DE GlcCer (μ g)	CONCENTRACIÓN DE PE (μ g)
5	0,027	0,133
10	0,053	0,265
20	0,106	0,530
40	0,212	1,060
80	0,424	2,120
160	0,848	4,240

- e5) Tras la medida del área del pico para la GlcCer y PE, se representó gráficamente los valores obtenidos para cada concentración de GlcCer y PE, y se ajustó la curva resultante empleando el programa informático GraphPad Prism 4.0 mediante la fórmula:

$$Y = A \cdot X^B$$

Así, se calcularon los valores para las constantes **A** y **B**, necesarias para extrapolar los valores del área tras analizar las muestras de extractos lipídicos, y poder determinar así la concentración de GlcCer y PE (*Figuras 3.3.9.2 y 3.3.9.3*).

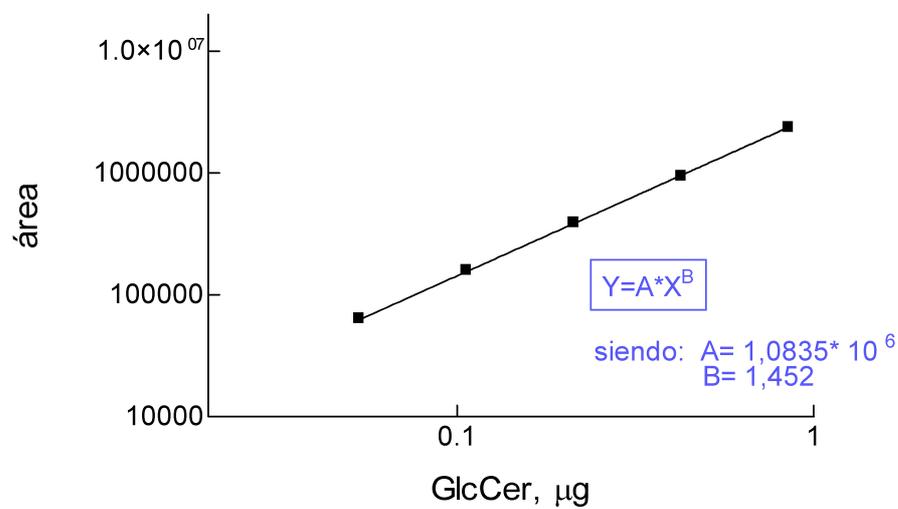


Figura 3.3.9.2. Curva de calibración obtenida tras ajuste de los valores del área del pico y concentración de GlcCer, que nos permitirá el cálculo de las constantes A y B, y la posterior estimación de la concentración de este glicolípido.

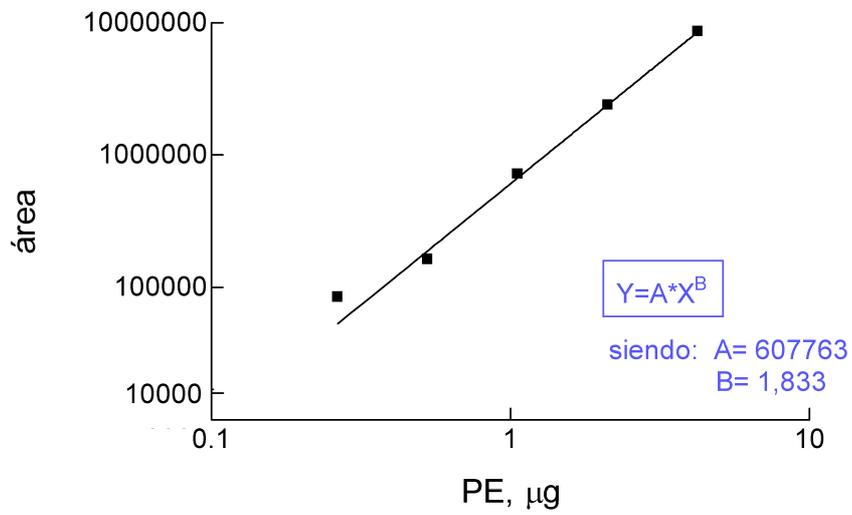


Figura 3.3.9.3. Curva de calibración obtenida tras ajuste de los valores del área del pico y concentración de PE, que nos permitirá el cálculo de las constantes A y B, y la posterior estimación de la concentración de este glicolípido.

3.4. - TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.4.1. EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

Para la realización de los diferentes estudios de biología molecular, aislamos el DNA genómico de doble cadena de los leucocitos de sangre periférica anticoagulada con EDTA de los individuos estudiados. Para ello empleamos el kit comercial Wizard Genomics DNA Purification Kit (Promega, Innogenetics).

El proceso de aislamiento de DNA consta de 4 etapas básicas:

- 1. Disgregación de la muestra.** En función del tipo celular del que se pretende aislar el DNA, existe una primera fase de lisis específica de las especies celulares que no interesan, disgregación celular, eliminación de la matriz extracelular, etc. Así, a partir de la sangre se van lisando y eliminando los eritrocitos, quedando intactos los leucocitos.
- 2. Lisis celular.** Basada en el empleo de detergentes que destruyen la membrana celular, liberando el contenido nuclear al exterior. Así, los leucocitos y su núcleo son lisados y solubilizados. Opcionalmente se puede degradar el RNA mediante incubación con una RNasa.
- 3. Desproteización.** Es la fase de eliminación de las proteínas mediante precipitación salina, quedando los restos celulares concentrados en el fondo, mientras que el DNA genómico permanece intacto en solución.
- 4. Precipitación del DNA.** Una vez purificado el DNA del resto de componentes celulares, se precipita con isopropanol, seguido de un lavado con etanol, y finalmente se resuspende en una solución tamponada donde se mantiene en las condiciones óptimas hasta su utilización.

Una vez aislado, se determinó la concentración del DNA mediante medida de la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific). El rendimiento medio del proceso de extracción de DNA genómico humano con este kit a partir de un volumen inicial de 300 µl de sangre total, era de 5 a 15 µg de DNA, aunque dependía de la cantidad de leucocitos presentes en la muestra. Seguidamente se preparó una solución de trabajo a una concentración de 7 ng/µl y se almacenó el resto del DNA a -20°C para evitar su degradación.

3.4.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue descrita en 1985 por Kary B. Mullis, que diseñó una manera sencilla y elegante de sintetizar *in vitro* grandes

cantidades de un fragmento específico de DNA, basándose en el procedimiento que la célula emplea *in vivo*. Mediante este método enzimático una DNA polimerasa sintetiza múltiples copias de un fragmento de DNA a partir de dos oligonucleótidos sintéticos o cebadores complementarios a cada hebra molde en los extremos de la zona que queremos amplificar, y una mezcla con los cuatro desoxiribonucleósidos trifosfato (dNTPs). La reacción consta de la sucesión de una serie de ciclos en los que tiene lugar la desnaturalización del DNA molde mediante elevadas temperaturas, la posterior hibridación de los cebadores y la elongación del DNA por parte de la DNA polimerasa en dirección 3' de cada monohebra molde, originándose una acumulación exponencial de fragmentos de DNA, puesto que los productos de un ciclo son utilizados como molde del ciclo siguiente, alcanzándose así un número de copias finales de 2^n , siendo n el número de ciclos. El proceso se lleva a cabo en un termociclador, que realiza los cambios de temperatura necesarios para cada ciclo de forma rápida, además de permitir establecer un número de ciclos deseado.

El correcto diseño de la secuencia de oligonucleótidos cebadores es esencial para el funcionamiento de la reacción y la obtención de un producto específico. Además, las condiciones de amplificación de cada fragmento génico deseado deben diseñarse empíricamente. Actualmente existen diferentes programas de ordenador capaces de diseñar los cebadores para los fragmentos que deseemos amplificar. En nuestros estudios empleamos el programa **OLIGO 4.0** o **Primer3 WWW primer tool** (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) o **v0.4.0.** (<http://frodo.wi.mit.edu/>) o **Primer3Plus** (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) para su diseño, y los programas **OLIGO CALCULATOR** (<http://micro.nwfsc.noaa.gov/protocols/oligoTMcalc.html>) y **OLIGO PROPERTIES CALCULATOR** (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>) para el análisis de sus características y compatibilidades.

Es importante asegurar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados. Para ello, se compara la secuencia diseñada con bases de datos compuestas de todas las secuencias de DNA disponibles en la Web, comprobando que no existe homología con otras regiones del genoma humano. Ello puede realizarse utilizando, por ejemplo, el programa **BLAST** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Además del correcto diseño de los cebadores, existe toda una serie de factores a tener en cuenta para obtener unos resultados de PCR de gran eficiencia y especificidad:

1. Concentración del DNA molde de partida, siendo lo recomendable añadir a cada reacción 5-10 ng de DNA genómico.
2. Composición y concentración salina del tampón empleado en la reacción, que suele variar, pero generalmente contiene cationes K^+ (KCl) que se unen a los grupos fosfato del DNA estabilizando la unión de los cebadores al molde, y/o NH_4^+ $[(NH_4)_2SO_4]$ que interacciona y desestabiliza los puentes de hidrógeno débiles formados entre bases mal apareadas.
3. pH del agente tamponante, normalmente Tris-HCl, siendo el pH ideal de 8,4, aunque para la amplificación de fragmentos más largos es mejor un pH 9,0.
4. Concentración de Mg^{2+} , determinado por la concentración de $MgCl_2$. Este ión es necesario como cofactor de la Taq polimerasa y, a su vez, estabiliza la hibridación cebadores-molde. Se recomienda utilizar una concentración final de 1,5 a 5 mM de Mg^{2+} .
5. Empleo de agentes coadyuvantes que aumentan el rendimiento y/o la especificidad de la reacción. Entre ellos tenemos: albúmina de suero bovino (BSA) acetilada, que estabiliza la Taq polimerasa uniéndose a los sitios inespecíficos del molde y dejando libres los específicos para la enzima; DMSO o Solución Q (QIAGEN) que facilitan la amplificación de secuencias ricas en GCs, al facilitar su separación; y glicerol o Nonidet P40 (NP40). La concentración de cada coadyuvante nunca debe superar el 10% (vol: vol) del volumen final de la reacción de PCR.
6. Concentración de los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), siendo recomendable utilizar una concentración final de 0,2 mM de cada dNTP, aunque la amplificación de fragmentos largos requiere una mayor concentración, que nunca debe ser superior a 1,5 mM.
7. Concentración de los cebadores, que suele ser de 200 a 600 nM de cada cebador. Una elevada concentración de cebadores da lugar a un mayor rendimiento, aunque puede inhibir la reacción por autodimerización.
8. Tipo de Taq polimerasa necesaria y unidades a emplear. Se recomienda utilizar 1-1,5 unidades del enzima.
9. Temperaturas y tiempos en los diferentes pasos de la reacción, así como el número de ciclos de amplificación necesarios para obtener el rendimiento adecuado, que se comprobará experimentalmente.

La amplificación de los diferentes fragmentos de interés se realizó en placa para PCR transparente de 96 pocillos de 0,2 ml de volumen (Eppendorf AG,

Hamburg, Alemania). Los termocicladores empleados fueron el Touchgene Gradient y el TC-412 (Techne).

Todas las reacciones se prepararon en hielo, utilizando guantes y material estéril, así como un juego de pipetas exclusivas para PCR. Además, para la amplificación de un mismo fragmento en diferentes muestras se preparó una mezcla con todos los componentes necesarios para amplificar el total de las muestras, excepto el DNA distribuido previamente en cada pocillo.

3.4.2.1. Amplificación del exón 4 del gen del EPCR

Las condiciones de amplificación del exón 4 del gen del EPCR fueron establecidas previamente (Medina P *et al*, 2004).

Las condiciones y componentes para dicha amplificación fueron:

PCR EPCR EXÓN 4 (EPCR 4) (313pb)	
Desnaturalización inicial: 94°C 4 min.	
32 ciclos sucesivos de:	
94°C	45seg.
55°C	45seg.
72°C	45seg.
Extensión final: 72°C	4 min.
Almacenaje a 4°C.	

COMPONENTES EPCR 4	VOL (µl)
DNA (7 ng/µl)	3
Tampón Leiden (10X)	5
DMSO	5
BSA (1mg/µl)	5
dNTPs (10 mM/cada uno)	1,3
Primer 5' EPCR4-F (10 pmol/µl)	1,1
Primer 3' EPCR4-R (10 pmol/µl)	1,1
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,3
dH ₂ O	28,4
Volumen final	50

Las principales características del par de cebadores empleados en la reacción, quedan resumidas en la tabla 3.4.2.1.

3.4.2.2. Amplificación del fragmento del gen de la TM que incluye las regiones EGF y Ser/Thr de la trombomodulina

Las condiciones de la PCR para la amplificación del fragmento del gen de la TM que incluye la región con el dominio EGF y parte de la región rica en Ser/Thr, y que denominamos fragmento I, fueron establecidas previamente, obteniendo dos tamaños de amplificado diferentes según la técnica a emplear para el genotipado del polimorfismo de interés en este gen.

Las condiciones y componentes para dicha amplificación fueron:

PCR TM fragmento I (TMI)(630pb) (Secuenciación directa)	
Desnaturalización inicial: 94°C 4 min.	
32 ciclos sucesivos de:	
94°C	45seg.
62,5°C	45seg.
72°C	45seg.
Extensión final: 72°C	4 min.
Guardamos a 4°C.	

COMPONENTES TMI (Secuenciación directa)	VOL (µl)
DNA (7 ng/µl)	3
Tampón ST (10X)	5
dNTPs (10 mM/cada uno)	1
Primer 5' TM16 (10 pmol/µl)	0,3
Primer 3' THRMOD2 LEIDEN (1485 ng/µl)	0,135
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,3
dH2O	40,27
Volumen final	50

TABLA 3.4.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS CEBADORES EMPLEADOS PARA AMPLIFICAR EL EXÓN 4 DEL GEN DEL EPCR

EXÓN	PAREJAS DE CEBADORES (secuencia 5' a 3')	TAMAÑO (pb)	CONTENIDO GC (%)	POSICIÓN	PM	Temperatura de annealing (°C)	Tamaño del amplificón (pb)	CEBADOR DE SECUEN- CIACIÓN
4	EPCR4-F: GCTTCAGTCAGTTGGTAAAC	20	45	4427-4446	6132,08	50	314	EPCR4-F
	EPCR4-R: TCTGGCTTCACAGTGAGCTG	20	55	4740-4721	6124,05	54		

TABLA 3.4.2.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS CEBADORES EMPLEADOS PARA AMPLIFICAR EL FRAGMENTO I DEL GEN DE LA TROMBOMODULINA

REGIÓN de la TM	PAREJAS DE CEBADORES (secuencia 5' a 3')	TAMAÑO (pb)	CONTENIDO GC (%)	POSICIÓN	PM	Temperatura de annealing (°C)	Tamaño del amplificón (pb)	TÉCNICA DE GENO- TIPADO
EGF+ Ser/Thr	TMI-F (TM23) CGGTACCTTCGAGTGCCAAT	20	55	1377-1396	6083,96	54	153	SSCPs
	TMI-R (TM24) ACGGCCGGAGGAGTCAAGGT	20	65	1529-1511	6232,08	58		
EGF+ Ser/Thr	TMG-F (TM16) GTGGCTTCGAGTGCCACTGC	20	65	1034-1053	-	58	630	SECUEN- CIACIÓN DIRECTA
	THRMOD2 LEIDEN-R CGCACTTGTACTIONCATCTTGGCCCTG	26	58	1663-1638	-	63		

PCR TM fragmento I (TMI)(153pb) (SSCPs)	
Desnaturalización inicial: 94°C 4 min.	
32 ciclos sucesivos de:	
94°C	45seg.
63°C	45seg.
72°C	45seg.
Extensión final: 72°C	4 min.
Almacenaje a 4°C.	

COMPONENTES TMI (SSCPs)	VOL (µl)
DNA (7 ng/µl)	3
Tampón ST (10X)	5
dNTPs (10 mM/cada uno)	1
Primer 3´ TM23 (10 pmol/µl)	3
Primer 5´ TM24 (10 pmol/µl)	3
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,3
dH ₂ O	34,7
Volumen final	50

Las principales características de cada pareja de cebadores empleadas en cada reacción, quedan resumidas en la tabla 3.4.2.2.

3.4.2.3. Amplificación de los 9 exones que componen el gen de la glucosilceramida sintasa (UGCG)

Para la detección de los polimorfismos en el gen de la UGCG utilizamos los pares de cebadores descritos por Beutler y colaboradores (2002), que amplifican cada uno de los 9 exones que componen el gen y las correspondientes regiones intrónicas flanqueantes.

Inicialmente optimizamos las condiciones de amplificación de estos 9 fragmentos. Para ello, realizamos una amplificación con 5 tampones de PCR de diferente composición con el fin de determinar las condiciones salinas, de pH y concentración de Mg²⁺ más adecuadas (Sambroock J *et al*, 1989c). También programamos una reacción de amplificación con tiempos y temperaturas estándar, empleando una temperatura de hibridación inicial igual a la T_m más baja de la pareja de cebadores. Los 5 tampones utilizados para las diferentes amplificaciones de los fragmentos fueron:

- **Tampón G (PCR Buffer, Invitrogen)**, compuesto por Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM y MgCl₂ 1,5 mM.
- **Tampón Q (PCR Buffer, Qiagen)**, compuesto por KCl y (NH₄)₂SO₄, y 1,5 mM de MgCl₂. Además, debe añadirse el coadyuvante Solución Q (10X).
- **Tampón Leiden**, compuesto por 10% DMSO (Sigma Chemical Co.), 5 µl de BSA 1 mg/ml (New England Biolabs), Tris-HCl 67 mM pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 16,6 mM, EDTA-Na₂ 6,7 µM, MgCl₂ 6,7 mM y β-mercaptoetanol 10 mM (Sigma Chemical Co.). Además, deben añadirse en la reacción los coadyuvantes BSA (1 mg/µl) y DMSO.
- **Tampón P**, compuesto por Tris-HCl 75 mM pH 9,0, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, MgCl₂ 1,5 mM y 0,01% Tween-20 (Sigma Chemical Co.).
- **Tampón ST**, compuesto por Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,1% Triton X-100 o DMSO y 0,01% gelatina (Sigma Chemical Co.).

Tras analizar los resultados en gel de agarosa, escogimos el tampón que produce una amplificación del producto más específica, y con un elevado rendimiento. En aquellos casos en que no se obtuvo ningún producto de amplificación, reajustamos las condiciones, bien mediante disminución de la concentración de cebadores si se habían formado grandes cantidades de heterodímeros, mediante la adición de agentes coadyuvantes a diferentes concentraciones, o bien ajustando la temperatura de hibridación del par de cebadores con un gradiente de forma que las muestras situadas en cada fila del bloque son incubadas a una temperatura diferente permitiendo la rápida valoración de hasta 12 temperaturas de amplificación diferentes en un único ensayo.

Así, los componentes y condiciones para la amplificación de los 9 exones de la UGCG fueron:

CONDICIONES PCR UGCG	
Desnaturalización inicial: 94°C 4 min.	
32 ciclos sucesivos de:	
94°C	45seg.
Temperatura de annealing específica de cada fragmento	45seg.
72°C	45seg.
Extensión final: 72°C	4 min.
Almacenaje a 4°C.	

T_m = 67°C (GC1 623 pb)

T_m = 60°C (GC2 416pb) ; (GC7 510pb)

T_m = 58°C (GC3 502pb) ; (GC4 378pb) ; (GC5 428pb);
; (GC6 434pb) ; (GC8 409pb) ; (GC9 584pb)

PCR GC1 (623 pb)

COMPONENTES	VOL (µl)
DNA (7 ng/µl)	3
Tampón Q (10X)	5
Solución Q	10
dNTPs (10 mM/cada uno)	1
Primer 5' GC1-F (10 pmol/µl)	3
Primer 3' GC1-R (10 pmol/µl)	3
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,25
dH ₂ O	24,75
Volumen final	50

PCR GC3 (502pb) ; GC4 (378pb) ; GC7 (510pb)

COMPONENTES	VOL (µl)
DNA (7 ng/µl)	3
Tampón P (10X)	5
dNTPs (10 mM/cada uno)	1
Primer 5' GC3-F; GC4-F; GC7-F (10 pmol/µl)	3
Primer 3' GC3-R; GC4-R; GC7-R (10 pmol/µl)	3
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,3
dH ₂ O	34,7
Volumen final	50

PCR GC2 (416pb) ; GC5 (428pb) ;
GC6 (434pb) ; GC9 (584pb)

COMPONENTES	VOL (µl)
DNA (7 ng/µl)	3
Tampón ST (10X)	5
dNTPs (10 mM/cada uno)	1
Primer 5' GC2-F; GC5-F; GC6-F; GC9-F (10 pmol/µl)	3
Primer 3' GC2-R; GC5-R; GC6-R; GC9-R (10 pmol/µl)	3
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,3
dH ₂ O	34,7
Volumen final	50

PCR GC8 (409pb)

COMPONENTES	VOL (µl)
DNA (7 ng/µl)	3
Tampón G (10X)	5
MgCl ₂	1,5
dNTPs (10 mM/cada uno)	1
Primer 5' GC8-F (10 pmol/ul)	3
Primer 3' GC8-R 10 pmol/ul)	3
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,3
dH ₂ O	33,2
Volumen final	50

Las principales características de cada pareja de cebadores empleadas en cada reacción, quedan resumidas en la tabla 3.4.2.3.

3.4.2.4. Comprobación de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar la eficiencia y especificidad de la PCR, se sometió a electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio una alícuota de cada uno de los productos amplificados, y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Sambroock *J et al*, 1989b & 1989e).

En todos los casos se utilizaron geles de agarosa (MS8, Pronadisa, Hispanlab) al 1,5%, en tampón TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA-Na₂ 2 mM, pH 8,0) conteniendo 0,5 µg de bromuro de etidio (Sigma Chemical Co.) por ml de gel. Las muestras aplicadas al gel contenían 8 µl del producto de amplificación mezclado con 2 µl de tampón de carga, compuesto por EDTA-Na₂ 5 mM, pH 8,0, glicerol al 50% (Quimivita), azul de bromofenol al 0,01% (Sigma Chemical Co.) y xylene cyanol al 0,01% (Sigma Chemical Co.).

TABLA 3.4.2.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS CEBADORES EMPLEADOS PARA AMPLIFICAR LOS 9 EXONES QUE COMPRENEN EL GEN DE LA UGCG.

EXÓN	PAREJAS DE CEBADORES (secuencia 5' a 3')	TAMAÑO (pb)	CONTENIDO GC (%)	PM	Temperatura de annealing (C°)	Tamaño del amplicón (pb)	CEBADOR DE SECUENCIACIÓN
1	GC1F: GGAGCCCCGGCGGCGAGACG	19	84	5904,8	64	623	GC1F
	GC1R: GCCGGTCCGAGGGGCGAG	18	83	5606,7	62		
2	GC2F: TCAAAGCCATGCTTACCTGG	20	50	6077	52	416	GC2F
	GC2R: AATACCTCACCTTATACAGTG	22	36	6653,4	49		
3	GC3F: ATGGCAAGACTGCAGTTGTG	20	50	6197,1	52	502	GC3F
	GC3R: AGGACGTAAACACCTCTCAG	20	50	6095	52		
4	GC4F: GTTTTCCTTTTGAGAATGGACAG	23	39	7084,7	52	378	GC4R
	GC4R: AAAGAACTCATGAATGTATCTGAG	24	33	7408,9	51		
5	GC5F: TTGTATTCTCCTCAGAAAGGTGG	23	43	7069,7	53	428	GC5F
	GC5R: GGGCTTCTAGAACACAGCAGG	21	57	6480,3	56		
6	GC6F: AAAAACAGTTCGTGAACACCATG	20	39	7049,7	52	434	GC6F
	GC6R: AGGTGACAGAGCAAGACTCTG	23	52	6504,3	54		
7	GC7F: GAATACCGGCAGTTGCCTGG	20	60	6158	56	510	GC7F
	GC7R: TTTGTATGGCCTACGCTCTGATG	23	48	7036,6	55		
8	GC8F: GAGAATGGTCTTTCTATCACAGG	23	43	7078,8	53	409	GC8R
	GC8R: GGGAAGCTGAAGAATGGCTCAG	22	55	6873,5	57		
9	GC9F: TCTTGAACGGTATAACATGGCAG	23	43	7087,7	53	584	GC9F
	GC9R: ATGAACGAACCCAGGTTCTAG	22	50	6728,4	55		

3.4.3. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN

Una vez amplificados los fragmentos de DNA mediante PCR, se deben purificar para eliminar las impurezas, cebadores, sales, enzimas, nucleótidos no incorporados, coadyuvantes, etc, presentes en la mezcla de reacción de la PCR y que podrían interferir de forma negativa en las siguientes fases del análisis. Esta purificación se realizó utilizando el ensayo comercial QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen), que permite la recuperación de un 90%-95% del producto amplificado, con un tamaño de 100-10.000 pb, eliminando los contaminantes y fragmentos de DNA de un tamaño inferior a 40 pb, como son los cebadores.

Brevemente, el producto amplificado se introdujo en una columna de gel de sílice con elevadas concentraciones de sales. Tras la adsorción del DNA a la columna, ésta se centrifugó a ≥ 10000 x g durante 30-60 segundos, eluyendo las impurezas de la mezcla de reacción de la PCR. A continuación, se eluyó el DNA adsorbido a la columna mediante la adición de 30 a 50 μ l de tampón Tris-Cl 10 mM, pH 8,5 al centro de la columna y centrifugación durante 1 minuto a ≥ 10000 x g. La eficiencia de la elución es fuertemente dependiente de la concentración de sales y del pH del tampón de elución, siendo una baja concentración de sales y un pH básico (entre 7,0 y 8,5) las condiciones más eficaces. Es conveniente dejar incubar la columna durante 1 minuto antes de la centrifugación final, ya que así se obtiene un DNA más concentrado.

3.4.4. GENOTIPADO DE LAS MUESTRAS

La detección de las mutaciones o polimorfismos puede realizarse mediante diferentes estrategias (Izquierdo M *et al*, 1993; Prosser J, 1993; Grompe M *et al*, 1993). Si lo que se desea es detectar nuevas mutaciones, como en el caso de la UGCG, es conveniente analizar los fragmentos amplificados mediante secuenciación directa, previa purificación del producto de PCR. Si se conoce la mutación, ésta puede analizarse por análisis de conformación de la cadena sencilla (SSCP), por análisis de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), por TaqMan, o por mini-secuenciación.

3.4.4.1. SECUENCIACIÓN DIRECTA

La secuenciación de los fragmentos de PCR se llevó a cabo en un secuenciador automático, siguiendo el método de secuenciación del DNA

enzimático descrito por Sanger y colaboradores (1981), pero realizando el marcaje de los fragmentos con fluorocromos, para evitar el uso de material radioactivo y automatizar la lectura e interpretación de la secuencia (Smith LM *et al*, 1986; Sambroock J *et al*, 1989a).

Se parte del fragmento de DNA amplificado y purificado, un cebador específico y complementario a la secuencia DNA del fragmento amplificado, una DNA polimerasa y nucleótidos marcados con fluorescencia. La polimerasa va incorporando de forma aleatoria dNTPs y ddNTPs marcados con un fluoróforo, al extremo 3' de la cadena en crecimiento. Cuando la polimerasa introduce un dideoxido se termina la cadena, puesto que no dispone de extremo OH-3' al que unir un nuevo nucleótido. De esta manera se obtiene un conjunto de subcadenas de DNA de tantos tamaños como unidades de bases tiene el fragmento analizado que, tras ser purificados mediante precipitación con isopropanol, son analizados mediante electroforesis capilar en gel de acrilamida. El secuenciador lee la secuencia de DNA puesto que cada uno de los ddNTPs terminadores contiene un fluoróforo diferente con espectros de excitación y emisión cercanos al infrarrojo: fluoresceína, N-2'-aminoetilo sulfato-7'-nitrobenzilo-2'-oxa-1',3'-diazole (NBD), Rojo de Texas y Tetrametilrodamina.

La electroforesis capilar se realiza de forma continua en un solo capilar y en condiciones desnaturalizantes. Así, conforme cada una de las subcadenas de DNA va avanzando a través del gel pasan por un rayo láser que excita al fluorocromo del ddNTP terminador correspondiente, generándose una señal fluorescente específica para cada base. La señal es recibida por un fotomultiplicador y transmitida a un ordenador, que procesará los datos generando la secuencia del fragmento de DNA completa y presentándola en forma de cromatograma.

En nuestro caso empleamos el secuenciador automático DNA Analyzer 3730 ABI PRISM® (Applied Biosystems).

El cebador empleado para la secuenciación fue el mismo utilizado para la amplificación de cada fragmento, aunque seleccionamos el directo o el reverso según generen un menor ruido de fondo en la secuenciación (TABLAS 3.4.2.1 A 3.4.2.3).

En caso de aparecer mutaciones, comprobamos que no se trataban de artefactos de la secuenciación, secuenciando por el extremo opuesto y confirmando que seguían apareciendo.

Posteriormente se analizaron todas las secuencias obtenidas, comparándolas con la secuencia de referencia obtenida de la base de datos del *National Center for*

Biotechnology Information (NCBI) (Sherry ST *et al*, 2001; Pruitt KD *et al*, 2003) Entrez Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) que proporciona toda la información disponible de un gen sobre secuencias de referencia de DNA genómico (gDNA), RNA y proteína.

Para el gen de la UGCG tomamos como referencia la secuencia *AL_442066 Human DNA sequence from clone RP11-57OD4 on chromosome 9, complete sequence*, analizando los nueve exones y la parte intrónica amplificada.

La secuencia tomada como referencia para el gen del EPCR fue la *NM_006404 Homo sapiens protein C receptor, endothelial (EPCR) (PROCR), mRNA*, y para el gen de la TM la *NM_000361 Homo sapiens thrombomodulin (THBD), mRNA*.

3.4.4.2. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS MEDIANTE LA CONFORMACIÓN DE CADENAS SENCILLAS

La detección de mutaciones mediante SSCPs (Orita M *et al*, 1989; Glavac D *et al*, 1993; Meyer M *et al*, 1999) está basada en los cambios de conformación que presentan dos cadenas sencillas de DNA que difieren entre sí en un único nucleótido, que se pondrán de manifiesto en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes, al dar lugar a diferencias en el patrón de bandas para cada genotipo. Se llevó a cabo empleando el sistema DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad). Mediante esta técnica analizamos el polimorfismo A4600G del exón 4 del gen del EPCR, el polimorfismo C1418T del gen de la TM y el polimorfismo A34991G del exón 8 del gen de la UGCG.

Los pasos a seguir en todos los casos fueron los siguientes:

1. Desnaturalización y estabilización de las muestras de DNA para separar las dobles cadenas. Se realizó mediante incubación de las muestras a 95°C durante 7 minutos con un volumen 1:1 de una solución de carga compuesta de formamida al 98,75%, EDTA-Na²⁺ 5 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,0125% y *Xylene cyanol* 0,0125%. A continuación, la mezcla se introdujo en hielo al menos 5 minutos para evitar la renaturalización de las dobles cadenas. La presencia de azul de bromofenol y *xylene cyanol* en la mezcla nos indica el avance de la electroforesis, ya que las dobles cadenas de DNA avanzan 1,5-2 cm por detrás del *xylene cyanol*, siendo importante para parar la electroforesis en el momento adecuado.

2. Introducción de las muestras de DNA en el gel de poliacrilamida.

Preparamos un gel de poliacrilamida de 1 mm de grosor compuesto por una solución de acrilamida/bisacrilamida al 30% (ratio 29:1) (Bio-Rad Laboratories), con una concentración final variable según la movilidad de cada fragmento de DNA a estudiar. Además, añadimos en la mezcla glicerol, persulfato amónico y TEMED con el fin de mejorar la movilidad y resolución de las bandas de la electroforesis. Una vez polimerizado el gel, cargamos las muestras, incorporando además un control negativo con una muestra de DNA sin desnaturalizar, en la que sólo se observa la conformación de las dobles cadenas de DNA, y 3 controles positivos, con muestras para cada uno de los 3 genotipos posibles.

3. Electroforesis. La electroforesis se realizó con tampón TBE 1X a temperatura ambiente. El tiempo y voltaje utilizado se ajustó empíricamente para cada fragmento de DNA.

4. Tinción del gel de poliacrilamida. Las bandas separadas por electroforesis se visualizaron mediante tinción con plata, a temperatura ambiente y en agitación. Para ello realizamos los siguientes pasos:

- a) Fijación de las bandas en etanol al 10% durante 5 -10 minutos.
- b) Decantación del etanol y oxidación del gel con una solución de HNO_3 al 1% durante 3 minutos.
- c) Decantación y lavado del gel con agua desionizada.
- d) Tinción del gel con una solución de plata (AgNO_3) de 2,02 g/l, durante 20 minutos.
- e) Decantación y lavado del gel con agua desionizada.
- f) Revelado con una solución de Na_2CO_3 (anhidro) a 29,6 g/l a la que se le añade 540 μl de formaldehído al 37%, dejando en agitación hasta visualizar las bandas esperadas.
- g) Detenemos la reacción mediante adición de ácido acético al 5%, manteniendo en agitación durante 5 minutos.
- h) Decantación y adición de agua desionizada para la conservación del gel.

5. Secado del gel. Para ello empleamos un secador de geles (Gel Dryer 543, Bio-Rad), durante aproximadamente 2 h a 75°C, consiguiendo una mejor conservación y visualización de las bandas.

Para la detección del **polimorfismo A4600G del exón 4 del gen del EPCR**, que produce un cambio de Serina a Glicina en el residuo 219 situado en la región transmembrana del gen, se utilizó un gel de poliacrilamida de 1 mm de grosor

compuesto por: 8% solución acrilamida/bis, 7% glicerol, 10% tampón TBE, 0,1% de persulfato amónico, y 0,1% de TEMED. Cargamos 10 µl del producto de PCR del exón 4 del gen del EPCR (PCR EPCR4), dejando correr en tampón TBE 1X aproximadamente 17 h a 125 V y 1,5h a 225 V, a temperatura ambiente.

Para la detección del **polimorfismo C1418T del gen de la TM**, que produce un cambio de aminoácido de Alanina a Valina en el residuo 455 situado en el sexto motivo tipo *EGF* del gen, se empleó un gel de poliacrilamida de 1 mm de grosor compuesto por: 8% solución acrilamida/bis, 7% glicerol, 10% tampón TBE, 0,1% de persulfato amónico, y 0,1% de TEMED. Cargamos 10 µl del producto de PCR para el fragmento I del gen de la TM (PCR TMI-ST), dejando correr en tampón TBE 1X aproximadamente 3 h a 360 V, a temperatura ambiente.

Para el genotipado del **polimorfismo A34991G del exón 8 del gen de la UGCG** se empleó un gel de poliacrilamida de 1 mm de grosor compuesto por: 6% solución acrilamida/bis, 5% glicerol, 10% tampón TBE, 0,1% de persulfato amónico, y 0,1% de TEMED. Cargamos 5 µl del producto de PCR del exón 8 del gen de la UGCG, dejando correr las muestras en tampón TBE 1X 19 h. a 150 V, a temperatura ambiente.

3.4.4.3. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS POR LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN

El DNA se puede fragmentar de manera específica mediante endonucleasas de restricción de clase II que reconocen secuencias específicas de entre 4 y 7 pb de la secuencia de DNA, cortando el DNA por esta diana de restricción o en una posición adyacente, y dando lugar a fragmentos de extremos romos o cohesivos, según el corte sea en el centro de la secuencia o a cada extremo. Mediante el uso de estas enzimas de restricción podemos analizar la presencia de cambios en una base, inserciones/deleciones, etc, ya que suponen un cambio en la secuencia de reconocimiento de la enzima, y por tanto, eliminan o añaden una diana de restricción que dará lugar a fragmentos de DNA de diferentes longitudes según esté o no presente el cambio.

Es importante determinar la cantidad óptima de enzima para la digestión, realizada de forma empírica en cada ensayo, aunque normalmente se utiliza de 2 a 10 veces la concentración de DNA. La digestión dura entre 1 y 4 horas, y los fragmentos resultantes pueden separarse en función de su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa (de 200 pb a 50 kb), y visualizarse mediante tinción con bromuro de etidio

e iluminación UV. Si los fragmentos de DNA a separar son de pequeño tamaño (5-500 pb), la electroforesis se realiza en geles de poliacrilamida, en lugar de agarosa.

Es recomendable incluir en cada reacción diferentes tipos de controles:

- DNA control sin digerir, o bien el suministrado por la casa comercial.
- Muestras de DNA del mismo tipo que las muestras problema, de genotipo conocido.
- Una mezcla de todos los componentes de la reacción, pero sin enzima.

Existen diferentes bases de datos sobre enzimas de restricción, que nos permiten encontrar aquellas enzimas cuya diana de restricción queda modificada ante la presencia o ausencia de un cambio de nucleótido, de forma que se genera o se pierde un sitio de restricción. Principalmente hemos empleado el programa **WebCutter 2.0** (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>) y la base de datos de información sobre enzimas de restricción y proteínas relacionadas **REBASE** (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>).

Esta técnica se ha utilizado para genotipar el polimorfismo G4678C situado en la región 3'UTR del gen del EPCR, el polimorfismo A29312G en el intrón 5 del gen de la UGCG, y el polimorfismo G20210A en la región 3' UTR del gen de la protrombina.

Para el análisis del polimorfismo **G4678C situado en la región 3'UTR del gen del EPCR**, la presencia del alelo mutado genera una diana de restricción para la enzima DdeI (10U/μl, Invitrogen), con una secuencia de reconocimiento:



La digestión se realizó a 37°C durante 3h en placas para PCR de 96 pocillos de 0,2 ml (Eppendorf) dentro de un termociclador. La mezcla de reacción estaba compuesta por 2 unidades de enzima, 10X del tampón REACT3, que proporciona la casa comercial y está compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, y NaCl 100 mM, y entre 16-20 μl del producto amplificado.

En presencia del alelo 4678C, el fragmento de 314 pb da lugar a dos fragmentos de 252 y 62 pb, mientras que el alelo 4678G genera un único fragmento de 314 pb.

Para el análisis del polimorfismo **A29312G en el intrón 5 del gen de la UGCG**, la presencia del alelo mutado genera una diana de restricción para la enzima Msl I (5000 U/ml, New England BioLabs), con una secuencia de reconocimiento:



La digestión se realizó a 37°C durante 3 h en placas para PCR de 96 pocillos de 0,2 ml (Eppendorf), dentro de un termociclador. La mezcla de reacción estaba compuesta por 5 unidades de enzima, 10X del tampón NE2, que proporciona la casa comercial y está compuesto por NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, y ditiotreitól 1mM, pH 7,9, y 7 µl del producto amplificado.

En presencia del alelo 29312G, el fragmento de 428 pb da lugar a dos fragmentos de 314 y 114 pb, mientras que el alelo 29312A genera un único fragmento de 428 pb.

Para el genotipado del polimorfismo **G20210A en la región 3'UTR del gen de la protrombina** se utilizó la técnica descrita por Poort y colaboradores (1996), mediante el enzima HindIII (New England BioLabs), con una secuencia de reconocimiento:



En presencia del alelo 20210A, se crea un nuevo sitio de restricción para el enzima HindIII, de forma que el fragmento amplificado de 345 pb tras la digestión a 37°C con HindIII da lugar a dos fragmentos de 322 y 23 pb, mientras que en presencia del alelo 20210G se genera un único fragmento de 345 pb.

Los diferentes fragmentos generados tras las digestiones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5% y de 0,85 cm de grosor, corriendo a 100 V durante 2 h a temperatura ambiente, y visualizando los resultados con luz ultravioleta. Para la cuantificación de los tamaños de las bandas se utilizó como referencia un marcador de peso molecular de 100 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen).

3.4.4.4. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS MEDIANTE ENSAYO TaqMan

El análisis por TaqMan, o ensayo de la 5' endonucleasa, permite la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), inserciones/deleciones de hasta 6 pb, o la detección de nanopartículas magnéticas basándose en un ensayo de amplificación-detección tipo 5' nucleasa a partir de muestras de DNA genómico purificado (gDNA) o complementario (cDNA).

Se utilizó el ensayo comercial *CUSTOM TaqMan SNP GENOTYPING ASSAYS* (Applied Biosystems), en el que se emplean 2 cebadores para la amplificación de la secuencia que contiene el polimorfismo de interés, y 2 sondas TaqMan® MGB que nos permiten la diferenciación de alelos. Estas sondas son fragmentos de DNA de secuencia complementaria a nuestra secuencia molde, y compuestas de:

- En el extremo 5', un fluorocromo o “*reporter dye*” (R) que absorbe la luz a una longitud de onda específica y emite la luz a una longitud de onda más baja, es decir emite fluorescencia. Es del tipo VIC® o verde indocianina para la detección del ALELO 1 (X), y FAM® o rojo de metilo para la detección del ALELO 2 (Y).



FIGURA 3.4.4.4.1. Composición de la sonda fluorogénica tipo TaqMan® MGB.

- En el extremo 3':
 - Una sonda para ligandos de unión al surco menor o “*Minor Groove Binder*” (MGB), que permite aumentar la temperatura de unión de la sonda al DNA molde, minimizando la unión de sondas no complementarias y aumentando la eficiencia de unión de las sondas específicas y la robustez de la discriminación alélica.
 - Una molécula que bloquea la fluorescencia o “*quencher dye*” (Q), al absorber la luz emitida por el fluorocromo. Es del tipo TAMRA™ o N,N,N',N'-Tetrametil-6-carboxirodamina.

Así, en cada ciclo de la PCR, las sondas fluorogénicas hibridan específicamente en la región genómica complementaria del DNA molde, delimitada por los cebadores *forward* y *reverse*. En ese momento, la sonda está intacta, y la proximidad entre el fluorocromo y el bloqueador produce que cuando se irradia, el fluorocromo excitado transfiere su energía a la molécula más cercana, el bloqueador, en lugar de emitir fluorescencia (fenómeno FRET).

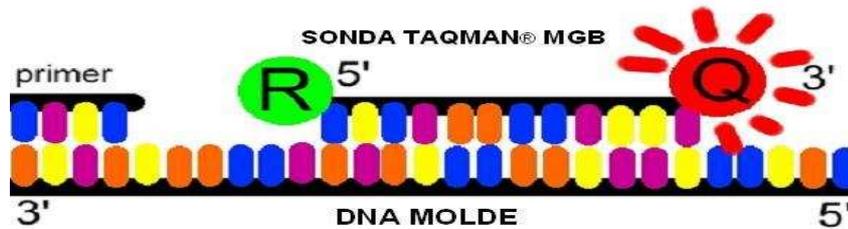


FIGURA 3.4.4.4.2. Unión específica de las sondas TaqMan en la región genómica complementaria del DNA molde, delimitada por los cebadores *forward* y *reverse*.

Gracias a la actividad 3'-5' exonucleasa de la Taq polimerasa, durante su avance para elongar la cadena complementaria, se produce la hidrólisis entre el fluorocromo y el bloqueador, y con ello, la emisión de fluorescencia. Esta señal de fluorescencia se acumula en cada ciclo de la amplificación, y se correlaciona con el alelo presente en la secuencia de DNA molde.

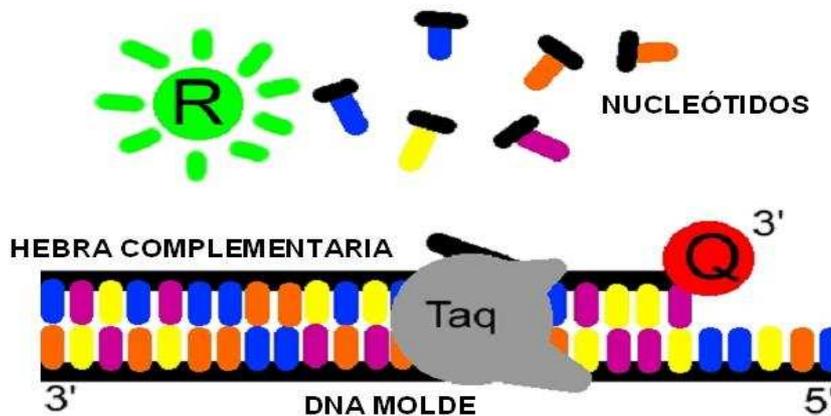


FIGURA 3.4.4.4.3. Actividad 3'-5' exonucleasa de la Taq polimerasa, durante su avance para elongar la hebra complementaria.

Las diferentes fases de las que consta el análisis, son:

1) **Diseño de las sondas** para la detección del polimorfismo, empleando el programa **FILE BUILDER SOFTWARE v3.0** de Applied Biosystems, que permitirá diseñar y evaluar la calidad de las sondas, con el fin de validar la aplicabilidad del análisis.

La secuencia molde para el diseño de las sondas, debe tener un tamaño entre 61 y 5000 pb, aunque el tamaño óptimo es de 600 pb, siendo aconsejable que el polimorfismo de interés quede en medio de la secuencia. Además, no conviene

abarcar más polimorfismos en la secuencia para evitar ambigüedades, o al menos que estén a 2 pb de diferencia con respecto al polimorfismo de interés. También es importante que el polimorfismo de interés quede al menos a 30 pb de los extremos 5' o 3' de la secuencia molde.

Los diferentes programas informáticos que se emplean para seleccionar la secuencia molde son:

- BLAST nucleotide-nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) que alinea la secuencia seleccionada como molde con las secuencias de las bases de datos disponibles, comprobando que ésta solamente es complementaria a la región del gen de estudio.
- ENTREZ GENE DATABASE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>) donde obtenemos toda la información que se conoce del gen de interés: exones, SNPs, productos de transcripción, etc.
- RepeatMasking (<http://www.repeatmasker.org/>) que permite la búsqueda e identificación de regiones repetidas en la secuencia diseñada.
- dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snpblastByOrg.cgi?>blastn>) donde obtenemos información de las sustituciones, deleciones o inserciones cortas presentes en nuestra secuencia a partir de la base de datos de DNA humano, comprobando que es el polimorfismo que buscábamos y verificando la ausencia/presencia de otros SNP en la secuencia diseñada.

2) **Reacción de amplificación**, en la que se requieren los siguientes componentes:

- De 1 a 20 ng de gDNA.

Se recomienda la cuantificación previa mediante espectrofotometría (medida A_{260}/A_{280}) (Haque KA *et al*, 2003), diluyendo en agua libre de DNAsa si la concentración es mayor a la recomendada. Además, se recomienda incluir controles negativos (solamente agua) y positivos (genotipo conocido para el polimorfismo de interés) en la placa a analizar.

- Kit para el genotipado a 40X o 80X, compuesto por cebadores *forward* y *reverse* específicos de la secuencia molde, y 2 sondas tipo MGB TaqMan®, una marcada con el fluorocromo VIC® para la detección del alelo 1, y la otra marcada con el fluorocromo FAM® para la detección del alelo 2. Se recomienda guardarlo en oscuridad entre -15 y -25°C, y realizar alícuotas de trabajo a 20X en tampón TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, libre de DNA, estéril y filtrado), para minimizar los ciclos de congelación /descongelación.

➤ Kit de amplificación de PCR, que contiene la DNA polimerasa. Utilizamos el kit qPCR CORE KIT (EUROGENTEC) que contiene 10X Reaction Buffer (Tris-HCl + KCl), MgCl₂ 50 mM, ddNTP mix 5 mM (dATP+dCTP+dGTP+dTTP+dUTP en agua desionizada autoclavada y titriada con NaOH, pH 7,0), y Hot GoldStar 5 U/μl.

La reacción se llevó a cabo en placas transparentes para PCR de 96 pocillos (SEMI-SKIRTED 96-WELL PCR PLATES CLEAR TYPE; CERTIFIED RNase, DNase, RNA AND DNA free; NEPTUNE), con un volumen final de 25 μl. El sellado de las placas de PCR se realizó empleando film transparente que permite la medida espectrofotométrica (MicroAmp™ OPTICAL ADHESIVE FILMS; Applied Biosystems).

El protocolo de amplificación consiste en:

TaqMan: reacción de amplificación	
Desnaturalización inicial: 95°C 10 min.	
40 ciclos sucesivos de:	
95°C	15 seg.
60°C	60 seg.
Almacenaje a 25°C.	

COMPONENTES	VOL (μl)
DNA (7 ng/μl)	2
Tampón A (10X)	2,2
MgCl ₂ (50 mM)	1,3
Assay Mix	0,3
dNTPs (5 mM/cada uno)	0,9
Hot GoldStar (5 U/μl)	0,1
dH ₂ O	15,2
Volumen final	22

Así, se parte de las muestras de DNA introducidas en cada uno de los pocillos de la placa de PCR. A continuación se prepara el mix de la reacción, previo cálculo del volumen total de cada reactivo necesario en el ensayo incluyendo 1 ó 2 reacciones extras para compensar las pérdidas de volumen que ocurren durante el pipeteo. Tras agitación y centrifugación del mix preparado en el momento, se añade en cada pocillo el volumen de mix correspondiente y a continuación, se sella la placa con film y se cubre con papel de plata para mantener en oscuridad. Se centrifuga suavemente para depositar la mezcla de la reacción en

el fondo de cada pocillo, y se inicia la reacción en el termociclador. Una vez terminada la PCR, se guarda la placa a 4°C envuelta en papel de plata para protegerla de la luz hasta el momento de la cuantificación por PCR en tiempo real a punto final. Las placas son estables a temperatura ambiente hasta 3 meses después de la reacción.

3) Lectura de los resultados

Tras la amplificación de la secuencia de interés, las placas se leen mediante ensayo a punto final en un sistema de PCR en Tiempo Real, con un software de detección que tras diferentes transformaciones matemáticas, convierte las fluorescencias obtenidas (emisión entre 500 y 660 nm) en valores de fluorescencia representados en una gráfica de coordenadas X/Y y asociadas a cada marcador fluorescente. Así, se puede discriminar 4 grupos de nubes de puntos o *clusters*, según la combinación de alelos presente en cada muestra, los cuales se pueden asociar a cada genotipo:

- 1. CONTROLES NEGATIVOS** sin muestra, por lo que no se produce la amplificación del DNA. También encontramos en este grupo aquellas muestras cuya amplificación ha fallado por errores de pipeteo, porque su DNA genómico contiene variaciones raras en su secuencia o duplicaciones, o porque su concentración está fuera del rango recomendado para el análisis.
- 2. ALELO X EN HOMOCIGOSIS.** Esta nube de puntos contiene las muestras con el alelo 1 en homocigosis, puesto que únicamente se detecta fluorescencia para VIC.
- 3. ALELO Y EN HOMOCIGOSIS.** Esta nube de puntos contiene las muestras con el alelo 2 en homocigosis, puesto que únicamente se detecta fluorescencia para FAM.
- 4. HETEROCIGOTO PARA EL ALELO 1 y 2.** Esta nube de puntos, situada en el centro de la gráfica, contiene las muestras con los alelos 1 y 2, puesto que se detectan ambas fluorescencias

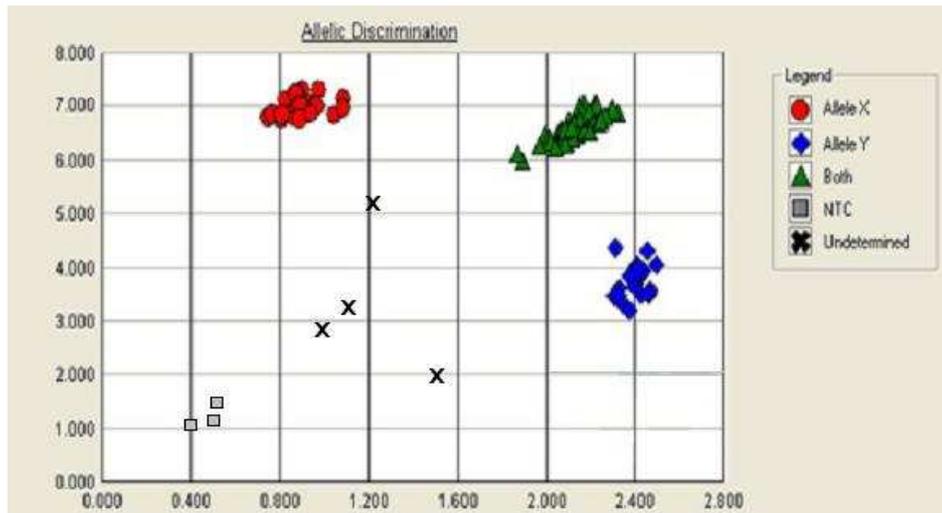


FIGURA 3.4.4.4. Ejemplo de los resultados de la discriminación alélica obtenida tras la lectura de la fluorescencia de la placa en RT-PCR a punto final. En rojo diferenciamos la nube de puntos con el alelo X y que contiene las muestras con el alelo 1 en homocigosis, puesto que únicamente se detecta fluorescencia para VIC. En azul diferenciamos la nube de puntos con el alelo Y y que contiene las muestras con el alelo 2 en homocigosis, puesto que únicamente se detecta fluorescencia para FAM. En verde y en el centro de la gráfica, diferenciamos la nube de puntos con los alelos X e Y, y que contiene por tanto las muestras heterocigotas para el alelo 1 y 2, puesto que detecta simultáneamente fluorescencia para ambos fluorocromos. Además, se incluyen en gris los controles negativos sin muestra de DNA. Aquellas muestras en las que la asignación de un grupo u otro no es clara, quedan representados por cruces, indicando que su genotipo está indeterminado.

En nuestro estudio empleamos el sistema **ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System**. Este sistema de detección de la señal fluorescente está compuesto por un sistema de lentes, filtros, un espejo dicróico que concentra la emisión de fluorescencia en una cámara “*charged-couple device*” (CCD), a partir de la cual la señal de fluorescencia es analizada por el software **ABI PRISM® 7000 SDS**. Mediante diferentes algoritmos matemáticos, resta la señal de fluorescencia por defecto, y después expresa la emisión de fluorescencia obtenida a partir de los estándares de calibración del aparato para los marcadores de fluorescencia seleccionados. Para ello se emplea la ecuación:

$$a (\text{FAM}) + b (\text{VIC}) + c (\text{ROX}) + d (\text{BACKGROUND}) + \text{MSE}$$

donde a, b y c son los coeficientes de la contribución de cada marcador fluorescente en la fluorescencia total.

La normalización de la intensidad de la emisión de fluorescencia se realiza dividiendo cada valor de fluorescencia por su valor de referencia intrínseco (Rn).

Dada la gran cantidad de muestras a analizar en el estudio del polimorfismo C1418T del gen de la TM procedentes de los otros hospitales participantes en el estudio, decidimos genotiparlas por Taqman. Sin embargo, la presencia de otras mutaciones cercanas al polimorfismo C1418T hizo que el diseño de las sondas y cebadores para este polimorfismo por esta técnica no fuera viable. Por ello, y en su lugar, decidimos genotipar el polimorfismo A2729C de la región 3' no traducida del gen de la TM, el cual está en completo desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo C1418T, y es posible estudiarlo por Taqman.

Los cebadores empleados para la **determinación del polimorfismo A2729C de la región 3' no traducida del gen de la TM mediante TaqMan**, fueron diseñados y fabricados por **Applied Biosystems**, junto con las 2 sondas TaqMan® MGB necesarias para el ensayo. La secuencia de nucleótidos de ambos cebadores fue:

PAREJA DE CEBADORES (secuencia 5' a 3')	
TM-A2729C-F	GTGTTGAAAATGTTTCAGAAGGTTGCT
TM-A2729C-R	AATCATGCAGTTTGAAGCTTTCTTGAA

3.4.4.5. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS MEDIANTE MINI-SECUENCIACIÓN

El análisis por mini-secuenciación o "*primer extension*" es un método rápido y fiable para la determinación de polimorfismos, permitiendo en una sola reacción el genotipado de varios polimorfismos simultáneamente (Syvanen AC *et al*, 1999). Partimos de un cebador diseñado específicamente para que la DNA polimerasa se una y amplifique en la posición donde se encuentra el nucleótido que presenta la variación o polimorfismo de interés. Cada extensión implica la unión de un único ddNTP marcado con un fluoróforo en la posición del polimorfismo, terminando la reacción. Los cebadores se diseñan con una cola extra poli-A, que no hibrida con el DNA molde pero permite la separación por tamaños de cada polimorfismo. Además, a cada polimorfismo se le asigna un fluoróforo y tamaño de "cola extra" específicos. Así, en una misma reacción tendremos productos amplificados de diferentes tamaños y con unos fluoróforos específicos, que nos permitirán identificar cada polimorfismo y que podrán ser separados electroforéticamente.

Las reacciones de extensión se llevaron a cabo empleando el **Kit ABI PRISM® SNaPshot Multiplex™ (Applied Biosystems)**. Los productos resultantes se purificaron con un sistema basado en esferas magnéticas, y se separaron mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático **ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems)**. La identificación de los genotipos se realizó con el software **GeneMapper (Applied Biosystems)**, que representa los electroferogramas con los diferentes picos de fluorescencia asociados a cada SNP.

3.4.4.5.1. PCR-multiplex

Partimos del gDNA, necesitando una primera fase de amplificación simultánea del DNA de todos los fragmentos que contienen los polimorfismos de interés, o PCR-multiplex. Para ello y primero, se diseñaron los cebadores para la PCR-multiplex, empleando el software **Primer3**. Diseñamos los cebadores para amplificar fragmentos cortos que contienen el polimorfismo de estudio y al menos con 40 ó 50 pb a cada lado, e intentando obtener fragmentos con diferencias de tamaño resolubles en un gel. Posteriormente verificamos cada cebador, atendiendo a la complementariedad y formación de horquillas, T_m , tamaño mínimo, óptimo y máximo, % GCs, etc., mediante el programa **OligoAnalyzer**. En la puesta a punto de la PCR-multiplex, es importante ajustar la concentración de cada cebador en la reacción (normalmente a 2 μM), la temperatura de hibridación (normalmente de 62 a 64°C), y el número de ciclos, siendo muy importante emplear un número de ciclos elevado con el fin de consumir la máxima cantidad de cebadores y aumentar el producto de la PCR.

Las reacciones de PCR-Multiplex se llevaron a cabo en placas para PCR de 384 pocillos, utilizando el Termociclador 9700 de Applied Biosystems y el Kit Multiplex PCR (Quiagen), empleando las siguientes condiciones:

PCR MULTIPLEX	
Desnaturalización inicial: 95°C 15 min.	
40 ciclos sucesivos de:	
95°C	20 seg.
62°C	1 min.
72°C	1 min. 15 seg.
Extensión final: 72°C 7 min.	

COMPONENTES	VOL (µl)
DNA genómico (50 ng/ml)	1-1,5
MasterMix (2X)	7
Solución Q	3
Mix oligos ^a	3
dH ₂ O	1
Volumen final	15

^a Oligos a concentraciones finales entre 0,4 y 0,8 µM

3.4.4.5.2. Purificación de los productos de PCR-multiplex

Una buena purificación de los productos amplificados es fundamental antes de pasar a la siguiente fase, la mini-secuenciación, ya que la presencia de restos de cebadores de la PCR-multiplex producirían picos inespecíficos en el caso de interacciones entre ellos y con los cebadores de la mini-secuenciación (algo posible pues en el diseño de los cebadores de mini-secuenciación no se tienen en cuenta las interacciones con los cebadores de PCR), y los restos de dNTPs provocan que en lugar de una mini-secuenciación se produzca una secuenciación (si sólo se debe incorporar una base es necesario que sólo haya terminadores; si hay dNTPs se elonga la cadena, y por poco que sea, ya no se puede interpretar el resultado).

La purificación de los productos de la PCR-multiplex se realizó en placas para PCR empleando el sistema de purificación basado en esferas magnéticas AMPure de BECKMAN. Los diferentes pasos fueron:

- a) Adición de 5 µl de esferas magnéticas a cada pocillo.
- b) Incubación de 5 minutos a temperatura ambiente.
- c) Incubación de 1 minuto en soporte magnético.
- d) Eliminación del sobrenadante.
- e) Adición de 20 µl de etanol al 70%, agitación de la placa, incubación de 1 minuto a temperatura ambiente y eliminación del sobrenadante.
- f) Repetición del paso anterior dos veces.
- g) Secado durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- h) Resuspensión de las esferas en 8 µl de agua desionizada y estéril, dejando incubarse al menos 5 minutos a temperatura ambiente.
- i) Paso del producto de amplificación purificado a una placa limpia, o uso directo si se utiliza el soporte magnético.

3.4.4.5.3. Mini-secuenciación

El diseño de los cebadores para la mini-secuenciación se realizó empleando el software **SBE-PRIMER DESIGN**, analizándolos mediante el programa **FastPrimer**. Este programa da un informe sobre las posibles interacciones de los cebadores entre sí, además de estimar un valor de calidad relativa para cada cebador. Seleccionamos la mejor combinación de cebadores obtenida. Los cebadores de mini-secuenciación deben diseñarse en posición +/- 1 pb del polimorfismo de interés, en cualquiera de las dos hebras. Una vez diseñados los cebadores, se les van añadiendo las colas extras poli-A que les darán el tamaño definitivo a los fragmentos amplificados para cada polimorfismo. Los tamaños finales deben ir incrementándose de 5 en 5 pb para conseguir una óptima resolución electroforética (el tamaño máximo de un fragmento para una buena resolución en la mini-secuenciación es de 120 pb). También es aconsejable evitar polimorfismos consecutivos con el mismo cambio de base. Para ello se debe jugar con el tamaño de las colas, con el fin de colocarlos alternados, o también, es posible diseñar los cebadores para la detección del polimorfismo con las bases complementarias. Además, conviene que los cebadores de minisequenciación tengan el máximo grado de pureza, o grado HPLC.

Para la optimización de la reacción, es importante ajustar la concentración de cebadores (normalmente de 0,01 a 0,05 μM), temperatura de hibridación (es aconsejable utilizar una temperatura de hibridación mayor a la empleada en la PCR-multiplex, con el fin de evitar que aún en el caso de que queden restos de cebadores de PCR por purificación ineficaz, éstos hibriden, y evitando así la aparición de picos inespecíficos en la mini-secuenciación. Normalmente entre 80 y 82°C), y el número de ciclos. Además, se debe incluir controles negativos en la reacción y comprobar que no dan señal, o que si la dan, la intensidad de fluorescencia esté muy por debajo de los picos del análisis (200-300 uF vs 3000-5000 uF).

La minisequenciación se realizó utilizando el kit ABI PRISM® SNaPshot Multiplex™ (Applied Biosystems), empleando las siguientes condiciones:

MINISECUENCIACIÓN	
30 ciclos sucesivos de:	
96°C	10 seg.
68°C	35 seg.

COMPONENTES	VOL (µl)
DNA molde (PCR-multiplex purificada)	1-1,5
MasterMix (2X)	1,5
Mix oligos ^a	0,5
dH ₂ O	1,5
Volumen final	5

^a Oligos a concentraciones finales entre 0,01 y 0,06 µM

La mezcla para cargar en el analizador consistió en 1,5 µl del producto de mini-secuenciación, 5 µl de formamida y 0,02 µl de marcador de tamaños **LIZ 120 (Applied Biosystems)**. Tras la desnaturalización, la mezcla se carga en el secuenciador **DNA analyzer 3730 de Applied Biosystems**. El resultado de las carreras se analizó con el software de genotipado **GENEMAPPER de Applied Biosystems**, obteniendo los electroferogramas con los picos para cada polimorfismo y muestra.

3.5. - ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS 11.5 para Windows (SPSS Inc. Chicago), considerando un valor de $P < 0,05$ estadísticamente significativo.

Las variables continuas se expresaron como media y desvío estándar (DE) o como mediana y rango (percentiles 10-90), según su distribución fuera o no normal, empleando para ello la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov.

Todas las características clínicas de los pacientes y controles, excepto la edad, se compararon utilizando el ensayo de la χ^2 con 1 grado de libertad.

Las diferencias de medias entre dos grupos se compararon mediante la prueba t de Student para variables con distribución normal, y con la prueba U de Mann-Whitney en aquellas variables que no presentaron una distribución normal. Las diferencias de medias entre más de dos grupos se compararon utilizando la prueba de ANOVA para variables con distribución normal y la prueba H de Kruskal-Wallis para aquellas variables que no presentaron una distribución normal.

Las correlaciones entre variables se establecieron mediante análisis de regresión lineal de Pearson, para variables con distribución normal, o el de Spearman, para aquellas variables que no presentaron una distribución normal.

Las frecuencias alélicas fueron calculadas mediante recuento genético.

La asociación entre genotipos o haplotipos y enfermedad se estudió mediante análisis de regresión logística o regresión múltiple. Los Odds ratio (OR), como medida del riesgo relativo, y los intervalos de confianza al 95% (IC 95%) se calcularon de acuerdo al modelo de Woolf B (1955).

4. – RESULTADOS

*“El que no posee el don de maravillarse ni de entusiasmarse,
más le valdría estar muerto,
porque sus ojos están cerrados”.
(Albert Einstein)*

4.1. ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS EN EL GEN DEL EPCR AL RIESGO DE VTE EN SUJETOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN 20210A EN EL GEN DE LA PROTROMBINA

Con el fin de estudiar la asociación entre el riesgo de VTE en portadores de la mutación 20210A en el gen de la protrombina (PT) y los polimorfismos 4600A/G y 4678G/C (haplotipos A3 y A1, respectivamente) del gen del EPCR, todos los individuos fueron genotipados para estos dos polimorfismos. Además, en todos ellos determinamos los niveles de sEPCR, APC, PT antigénica (Ptag) y funcional (PTact), y fragmentos 1+2 de la PT (F1+2).

4.1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS INDIVIDUOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN 20210A EN EL GEN DE LA PROTROMBINA INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Como se indica en material y métodos, el estudio incluyó 84 familias en las que al menos uno de sus miembros (propósito) tenía una historia de VTE y era portador de la mutación 20210A en el gen de la PT. Además de los 84 propósitos, se estudiaron 302 familiares, 162 de ellos con la mutación (13 con historia de VTE) y 140 sin la mutación (dos de ellos con historia de VTE).

TABLA 4.1.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS INDIVIDUOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN 20210A EN EL GEN DE LA PROTROMBINA.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	PROPÓSITOS (n=84)	FAMILIARES SINTOMÁTICOS (n=13)	FAMILIARES ASINTOMÁTICOS (n=149)
Edad (años)*	44 ± 14 (20-74)	48 ± 13 (31-78)	42 ± 16 (16-84)
Edad en el momento del VTE (años)*	40 ± 13 (18-70)	37 ± 12 (20-57)	--
Hombres, n (%)	37 (44)	7 (54)	62 (42)
Portadores del alelo 20210G en homocigosis, n (%)	3 (4)	0 (0)	1 (1)
Factor V Leiden, n (%)	6 (7)	2 (15)	5 (3)
Deficiencia PC, n (%)	2 (2)	1 (8)	2 (1)

La tabla 4.1.1 muestra las características clínicas de los portadores de la mutación 20210A del gen de la PT. No se encontraron diferencias significativas para ninguno de los parámetros estudiados entre familiares sintomáticos y asintomáticos portadores de la mutación 20210A. Tres mujeres propósitos (de 20, 32 y 33 años de edad) y una familiar asintomática (de 28 años) eran homocigotas para la mutación 20210A.

4.1.2. GENOTIPADO DE LAS MUESTRAS PARA LOS POLIMORFISMOS 4600A/G Y 4678G/C DEL GEN DEL EPCR

La determinación del polimorfismo 4600A/G en el exón 4 del gen del EPCR se realizó mediante SSCPs (Medina P *et al*, 2004). En la figura 4.1.2.1 se muestra los resultados obtenidos tras someter las muestras a electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior tinción con plata, a fin de visualizar las bandas resultantes, observando un patrón de bandas diferente según el genotipo fuese 4600AA, 4600AG o 4600GG.

El polimorfismo 4678G/C, situado en la región 3' no traducible del exón 4 del gen del EPCR, se determinó mediante la enzima de restricción Dde I, puesto que la presencia del alelo 4678C genera una diana de restricción (Medina P *et al*, 2004). En la figura 4.1.2.3 se muestra los resultados obtenidos tras la digestión de las muestras y electroforesis en gel de agarosa, observándose un patrón de bandas diferente según el genotipo para el polimorfismo 4678G/C.

Las figuras 4.1.2.2 y 4.1.2.4 muestran los cromatogramas resultantes, tras secuenciación directa, para las regiones que incluyen los polimorfismos 4600A/G y 4678G/C respectivamente, realizadas en una serie de muestras que presentaban dichas mutaciones, con la finalidad de validar los resultados obtenidos mediante SSCPs y RFLPs. En todos los casos, los resultados obtenidos fueron idénticos, demostrando la validez de las técnicas utilizadas.

FIGURA 4.1.2.1. Genotipado del polimorfismo A4600G en el exón 4 del gen del EPCR mediante análisis por SSCPs. Los pocillos 1, 3 y 4 contienen muestras de genotipo AA. Los pocillos 2 y 6 contienen muestras de genotipo AG. El pocillo 5 contiene una muestra de genotipo GG. El pocillo 7 contiene como control una muestra amplificada sin desnaturalizar.

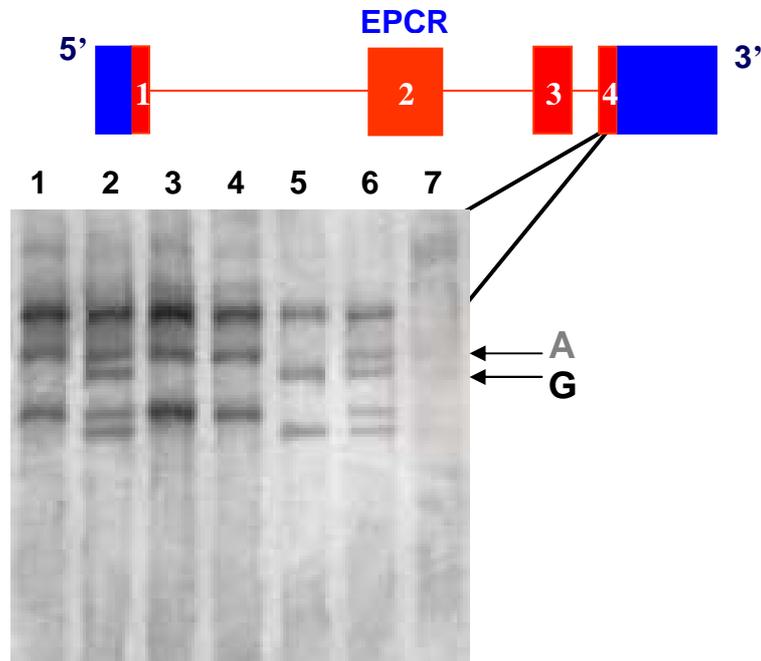


FIGURA 4.1.2.2. Patrón de secuenciación del polimorfismo 4600A/G en el exón 4 del gen del EPCR. El primer cromatograma corresponde a una muestra de genotipo normal AA, el segundo corresponde a una muestra heterocigota AG y el tercero corresponde a una muestra de genotipo mutado GG.

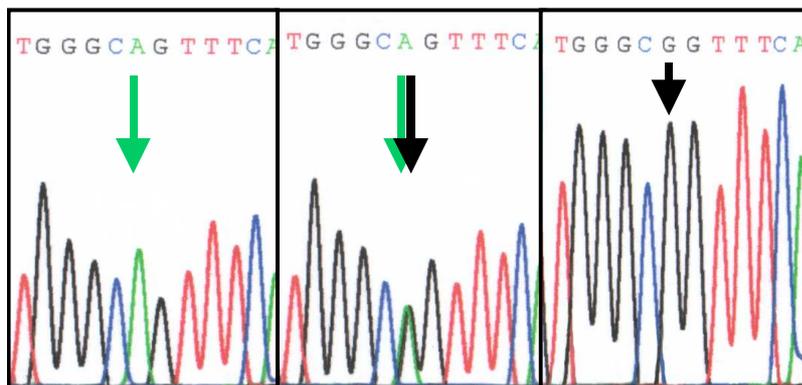


FIGURA 4.1.2.3. Genotipado del polimorfismo 4678G/C en la región 3' no traducible del gen del EPCR mediante análisis de restricción con el enzima Dde I. Los pocillos 1 y 8 contienen marcadores de peso molecular, de 100 pb y 50 pb respectivamente. El pocillo 2 contiene una muestra con genotipo GG, cuyo patrón es una única banda de 314 pb, que corresponde al tamaño del fragmento original obtenido por PCR. Los pocillos 3, 4 y 5 contienen muestras de genotipo GC, cuyo patrón de bandas es de 314 + 252 + 62 pb, esta última inapreciable en el gel. Los pocillos 6 y 7 contienen muestras de genotipo CC, cuyo patrón de bandas es de 252 + 62 pb, esta última inapreciable en el gel.

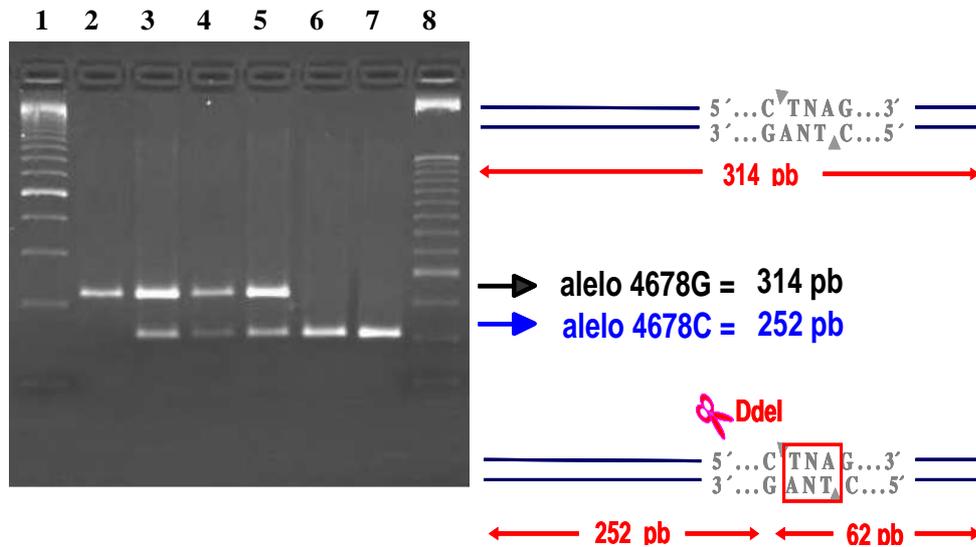
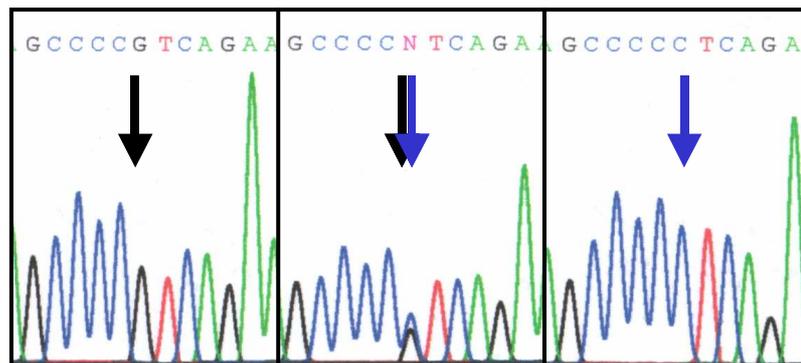


FIGURA 4.1.2.4. Patrón de secuenciación del polimorfismo G4678C en la región 3'UTR del exón 4 del gen del EPCR. El primer cromatograma corresponde a una muestra de genotipo normal GG, el segundo corresponde a una muestra heterocigota GC y el tercero corresponde a una muestra de genotipo mutado CC.



4.1.3. ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS EN EL GEN DEL EPCR CON EL RIESGO DE TROMBOSIS

Tras el genotipado de los dos polimorfismos marcadores de haplotipo en el gen del EPCR, observamos que la frecuencia del alelo 4600G (haplotipo A3) fue mayor en los 84 propósitos que en los 149 familiares asintomáticos (0,17 vs 0,07; $P < 0,001$) portadores de la mutación 20210A y, entre los familiares portadores, la frecuencia fue mayor en los 13 sintomáticos que en los 149 asintomáticos (OR=3,0; IC 95%=1,0-8,9). La frecuencia del alelo 4678C (haplotipo A1) fue menor en los propósitos que en sus familiares asintomáticos (0,37 vs 0,45; $P = 0,078$) portadores de la mutación 20210A. En los 149 familiares no portadores de la mutación 20210A, la frecuencia del alelo 4600G fue de 0,09, mientras que para el alelo 4678C fue de 0,47 (TABLA 4.1.3.).

Para identificar asociaciones entre los genotipos y el riesgo de VTE en portadores de la mutación 20210A, realizamos un análisis de regresión logística. En el análisis univariado, la presencia del alelo 4600G (haplotipo A3) aumentó significativamente el riesgo de VTE (OR=2,6; IC 95%=1,4-4,8). En el análisis multivariante, tras ajustar por edad, sexo, presencia de anticuerpos antifosfolípidos, presencia de factor V Leiden y presencia del otro polimorfismo en el gen del EPCR, el OR no se modificó significativamente (OR=2,5; CI 95%=1,3-5,0). Sin embargo, para el polimorfismo 4678G/C, en el análisis univariado se observó un descenso del riesgo de VTE a medida que aumentaba el número de alelos C (haplotipo A1) presentes, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística (OR GG vs. CC =0,5; IC 95%=0,2-1,1). En el análisis multivariante, tras ajustar por edad, sexo, presencia de anticuerpos antifosfolípidos, presencia de factor V Leiden y presencia del otro polimorfismo en el gen del EPCR, la disminución del riesgo de VTE se mantuvo (OR GG vs. CC =0,6; IC 95%=0,2-1,3) (TABLA 4.1.3.). Entre los propósitos, los eventos trombóticos idiopáticos, es decir los ocurridos en ausencia de factores de riesgo precipitante, ocurrieron más frecuentemente en los portadores del alelo 4600G (73%) que en los no portadores (57%), aunque la diferencia no fue significativa ($P = 0,224$), y la edad media del primer episodio trombótico fue menor en los portadores del alelo 4600G que en los no portadores ($P = 0,001$).

TABLA 4.1.3. DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS 4600A/G Y 4678G/C EN EL GEN DEL EPCR, E INFLUENCIA SOBRE EL RIESGO DE VTE EN PORTADORES DE LA MUTACIÓN 20210A DEL GEN DE LA PROTOMBINA.

POLIMORFISMO	PROPÓSITOS (N=84)		FAMILIARES ASINTOMÁTICOS (N=149)		OR (IC 95%)
	N	Frecuencia	N	Frecuencia	
4600A/G					
Genotipo AA	58	0,69	128	0,86	1*
Genotipo AG	24	0,29	21	0,14	2,7 (1,4-5,2) ^a
Genotipo GG	2	0,02	0	0	2,6 (1,3-4,8) ^b
Alelo A	140	0,83	277	0,93	--
Alelo G	28	0,17	21	0,07	2,6 (1,4-4,8) ^a
					2,5 (1,3-5,0) ^b
4678G/C					
Genotipo GG	33	0,39	44	0,30	1*
Genotipo GC	40	0,48	74	0,50	0,7 (0,4-1,3) ^a
Genotipo CC	11	0,13	31	0,20	0,8 (0,5-1,4) ^b
					0,5 (0,2-1,1) ^a
					0,6 (0,2-1,3) ^b
Alelo G	106	0,63	162	0,55	1*
Alelo C	62	0,37	136	0,45	0,7 (0,5-1,0) ^a
					0,7 (0,6-1,1) ^b

* Grupo de referencia.

^a Análisis univariante.

^b Análisis multivariante: ajustado para edad, sexo, presencia de la mutación factor V Leiden, anticuerpos antifosfolípidicos y el polimorfismo 4600A/G o 4678G/C en el gen del EPCR.

El análisis de las curvas de supervivencia mediante la prueba de Kaplan-Meier mostró que, entre los propósitos, la probabilidad de estar libre de trombosis a la edad de 40 años era menor en los 26 portadores (21%) que en los 58 no portadores (53%) del alelo 4600G ($P=0,010$). Por el contrario, en presencia del genotipo 4678GG o 4678CC, la edad a la cual el 50% de los propósitos había sufrido un evento trombótico fue similar ($P=0,329$), así como la probabilidad de estar libre de trombosis a los 40 años ($P=0,217$). Cuando el análisis se realizó únicamente en los familiares portadores de la mutación 20210A (13 sintomáticos y 149 asintomáticos), la edad media a la que ocurrió el primer episodio trombótico fue de 28 ± 10 años para los portadores del alelo 4600G y de 43 ± 10 años para los

no portadores ($P=0,019$), y la probabilidad de estar libre de trombosis a la edad de 40 años fue menor en los 26 portadores del alelo 4600G (20%) que en los 136 no portadores (60%) ($P=0,038$).

4.1.4. NIVELES DE sEPCR Y RIESGO DE TROMBOSIS

Puesto que el sEPCR puede competir con el EPCR de la membrana para unirse a la proteína C e inhibir así su activación por el complejo trombina-TM, quisimos valorar si los niveles de sEPCR estaban asociados con el riesgo de VTE. Para ello, comparamos los niveles plasmáticos de sEPCR en los 84 propósitos con los de sus 149 familiares asintomáticos portadores de la mutación 20210A. Tras excluir los 16 propósitos que estaban bajo tratamiento con anticoagulantes orales, los niveles plasmáticos de sEPCR eran significativamente mayores en los 68 propósitos que en los 149 familiares asintomáticos ($P<0,001$) (TABLA 4.1.4.1.).

TABLA 4.1.4.1. NIVELES PLASMÁTICOS DE PROTROMBINA Y EPCR soluble EN LOS 217 PORTADORES DE LA MUTACIÓN 20210A DEL GEN DE LA PROTROMBINA.

PARÁMETRO	PROPÓSITOS (N=68)	FAMILIARES ASINTOMÁTICOS (N=149)	P
Protrombina antigénica (%)	121 ± 10	117 ± 10	0,002
Protrombina actividad (%)	120 ± 9	116 ± 10	<0,001
Tiempo de protrombina (s)	11,0 ± 0,5	11,3 ± 0,6	0,012
sEPCR (ng/ml) TODOS	134 (87-417)	110 (74-258)	<0,001
Portadores genotipo 4600AA	126 (87-157)	105 (72-140)	<0,001
Portadores genotipo 4600AG+GG	344 (180-610)	287 (174-411)	0,124

Los valores son expresados como media ± DE o como mediana y rango (percentiles 10-90).

Puesto que los niveles plasmáticos de sEPCR están fuertemente asociados con la presencia del alelo 4600G del gen del EPCR (Saposnik B *et al*, 2004; Medina P *et al*, 2004; Uitte de Willige S *et al*, 2004), agrupamos los propósitos y familiares asintomáticos según fueran o no portadores del alelo 4600G. Se observó que los propósitos portadores del alelo 4600G tenían mayores niveles de sEPCR que los familiares asintomáticos ($P<0,001$) (TABLA 4.1.4.1.). Además, los niveles de sEPCR también tendían a ser más elevados en los familiares sintomáticos

portadores del alelo 4600G (344, 180-610 ng/ml) que en los familiares asintomáticos (105, 72-140 ng/ml) ($P=0,124$) (datos no mostrados en la tabla).

Estableciendo un punto de corte para los niveles plasmáticos de sEPCR de 147 ng/ml, correspondiente al percentil 80 de sEPCR en el grupo de portadores asintomáticos, 27 (40%) de los 68 propósitos sin terapia anticoagulante frente a solo 29 (19%) de los 149 familiares asintomáticos excedían este valor ($OR=2,73$; $IC\ 95\%=1,45-5,13$) ($P=0,002$). Tras ajustar por edad, sexo, presencia de la mutación factor V Leiden, presencia de anticuerpos antifosfolípidos, y presencia de los polimorfismos del EPCR, el OR no varió significativamente. Al distribuir los sujetos en cuartiles de acuerdo a los niveles de sEPCR de los individuos asintomáticos, comparado con el primer cuartil, los ORs para el segundo, tercer y cuarto cuartil eran 1,6 ($IC\ 95\%=0,4-5,19$), 3,2 ($IC\ 95\%=1,3-9,6$) y 4,6 ($IC\ 95\%=1,6-10,5$), respectivamente, de forma que el riesgo de VTE era mayor a medida que aumentaba el cuartil ($P<0,001$) (FIG. 4.1.4).

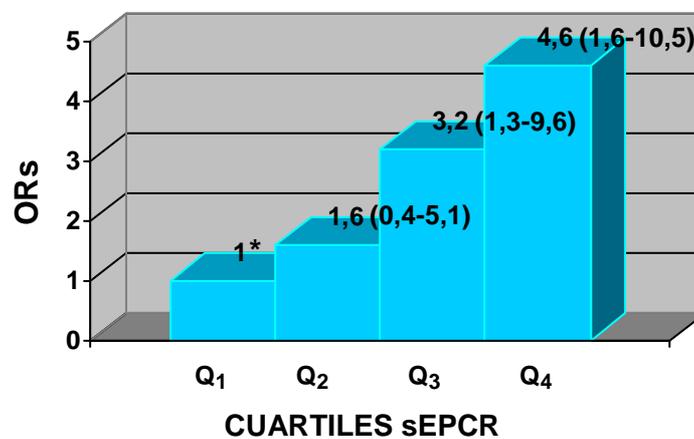


FIGURA 4.1.4. Relación dosis-respuesta entre los niveles de sEPCR distribuidos por cuartiles y el riesgo de TEV en portadores asintomáticos de la mutación 20210A en el gen de la protrombina.

ORs ajustados por edad, sexo, presencia de la mutación factor V Leiden, anticuerpos antifosfolípidos y polimorfismos en el gen del EPCR. En paréntesis intervalos de confianza al 95%.

* Grupo de referencia.

Se ha descrito que niveles elevados de sEPCR están asociados con la presencia del alelo 4600G del gen del EPCR. Por lo tanto, realizamos un análisis bivariante introduciendo como variables tanto un nivel de sEPCR mayor de 147 ng/ml como ser portador del alelo 4600G. El riesgo de VTE asociado a la presencia

del alelo 4600G disminuyó significativamente al ajustar para niveles elevados de sEPCR, desde 2,8 (IC 95%=1,4-5,5) hasta 1,5 (IC 95%=0,5-4,3), mientras que el riesgo de VTE para niveles aumentados de sEPCR no varió significativamente al ajustar para la presencia del alelo 4600G. Además, con el fin de evaluar si el efecto del alelo 4600G del gen del EPCR sobre el riesgo de VTE era debido a su efecto sobre los niveles de sEPCR, calculamos los ORs de sujetos portadores del alelo 4600G de acuerdo con los cuartiles de sEPCR. Comparado con el primer cuartil, los ORs para el segundo, tercer y cuarto cuartil eran 1,8 (IC 95%=0,2-15,4), 3,0 (IC 95%=0,4-22,7) y 6,0 (IC 95%=0,9-41,2) respectivamente, de forma que el riesgo de VTE era mayor conforme aumentaba el cuartil ($P<0,001$).

4.1.5. NIVELES DE PROTROMBINA Y RIESGO DE TROMBOSIS

Puesto que, al menos, uno de los mecanismos por los cuales los portadores de la mutación 20210A en el gen de la protrombina tienen un mayor riesgo de VTE es la presencia de niveles elevados de PT en plasma, medimos los niveles plasmáticos de PTag y PTact, así como el tiempo de protrombina, en todos los portadores de la mutación 20210A, excluyendo aquellos individuos bajo tratamiento con anticoagulantes orales (TABLA 4.1.4.1). Como se puede observar, tanto los niveles de PTag como PTact estaban significativamente más elevados en los 68 propósitos ($121\pm 10\%$ y $120\pm 9\%$) que en los 149 familiares asintomáticos ($117\pm 10\%$ y $116\pm 10\%$) ($P=0,002$ y $P<0,001$ respectivamente), mientras que el tiempo de protrombina era significativamente menor en los propósitos ($11,0\pm 0,5$ sec) que en sus familiares asintomáticos ($11,3\pm 0,6$ sec) ($P=0,012$).

Estableciendo un punto de corte para los niveles de PTag de 129%, correspondiente al percentil 90 del grupo de familiares asintomáticos, 19 de los 68 propósitos (28%) y 14 de los 149 familiares asintomáticos (9%) portadores de la mutación excedían este punto de corte (OR=3,8; IC 95%=1,8-8,3) ($P<0,001$). Así, individuos con niveles de PTag por encima del percentil 90 tenían más riesgo de VTE que aquellos individuos con niveles de PTag por debajo de este valor.

Al distribuir todos los individuos portadores de la mutación 20210A del gen de la protrombina de acuerdo a los cuartiles de los niveles de PTag, comparado con el primer cuartil, los ORs ajustados para el segundo, tercer y cuarto cuartil fueron 1,5 (IC 95%=0,5-4,3), 2,1 (IC 95%=0,8-6,0) y 3,4 (IC 95%=1,4-8,1) respectivamente, mostrando un mayor riesgo conforme aumentaban los niveles de PTag ($P=0,003$) (FIG. 4.1.5).

Para los niveles de PTact obtuvimos resultados similares.

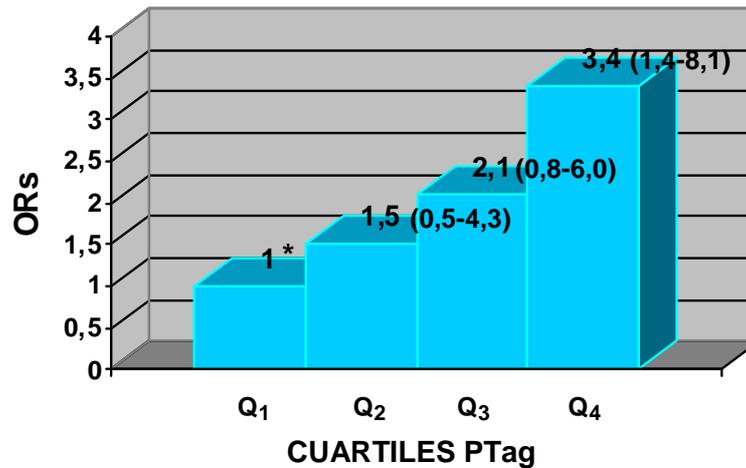


FIGURA 4.1.5. Relación dosis-respuesta entre los niveles antigénicos de protrombina distribuidos por cuartiles y el del riesgo de TEV en portadores asintomáticos de la mutación 20210A.

ORs ajustados para edad, sexo, presencia de la mutación factor V Leiden, presencia de anticuerpos antifosfolípidos, y polimorfismos en el gen del EPCR. En paréntesis se representa el intervalo de confianza (IC) al 95%.

* Grupo de referencia

4.1.6. NIVELES DEL FRAGMENTO 1+2 DE PROTROMBINA Y RIESGO DE TROMBOSIS

Existen evidencias que indican que el aumento del riesgo de VTE en portadores de la mutación 20210A del gen de la protrombina se debe a la asociación de esta mutación con un aumento de los niveles plasmáticos de PT, lo que llevaría a un incremento de la generación de trombina. Por ello, y con el fin de valorar la generación de trombina, medimos los niveles de F1+2 en todos los propósitos y familiares sin tratamiento con anticoagulantes orales. Observamos que los niveles de F1+2 estaban significativamente aumentados en los propósitos comparado con los familiares asintomáticos ($P=0,002$).

Los niveles de F1+2 estaban significativamente más elevados en los 64 propósitos (1,06; 0,77-1,89) que en los 131 familiares asintomáticos (0,98; 0,66-1,40) ($P=0,002$). Además, estableciendo como punto de corte un valor de F1+2 de 1,40 nM, correspondiente al percentil 90 del grupo de familiares asintomáticos, el

análisis de regresión mostró un OR de 3,0 (IC 95%=1,4-6,6), ajustado por edad, sexo, presencia de anticuerpos antifosfolípidos y presencia de la mutación factor V Leiden. Así, individuos con niveles de F1+2 por encima de este punto de corte tienen mayor riesgo de VTE que aquellos con niveles por debajo de este valor. Puesto que la mutación 20210A está asociada con niveles más elevados de PT, realizamos un análisis multivariante introduciendo en el modelo tanto el percentil 90 de F1+2 como el percentil 90 de PTag (TABLA 4.1.6). Solamente el percentil 90 de PTag permaneció significativamente asociado con un mayor riesgo de VTE (OR=2,4; IC 95% =1,1-5,4), mientras que el OR para el percentil 90 de F1+2 descendió significativamente (OR=1,4; IC 95%=0,7-5,0).

TABLA 4.1.6. RIESGO DE TEV PARA NIVELES ELEVADOS DE PTag Y DE F1+2 EN PORTADORES DE LA MUTACIÓN 20210A DEL GEN DE LA PROTROMBINA.

PARÁMETRO	PROPÓSITOS		FAMILIARES ASINTOMÁTICOS		OR (IC 95%)	
	n	frecuencia	n	frecuencia	MODELO 1	MODELO 2
Percentil 90 PTag	23	0,33	15	0,10	3,8 (1,8-8,3)	2,4 (1,1-5,4)
Percentil 90 F1+2	19	0,28	14	0,09	3,0 (1,4-6,6)	1,4 (0,7-5,0)

MODELO 1 = análisis multivariante (ORs ajustados para edad, sexo, presencia de anticuerpos antifosfolípidos, presencia de la mutación factor V Leiden y los polimorfismos del gen del EPCR).

MODELO 2 = como en el modelo 1 pero cada parámetro ajustado además por el otro parámetro.

4.1.7. NIVELES DE PROTEÍNA C ACTIVADA Y RIESGO DE TROMBOSIS

Nuestro grupo ha demostrado que un nivel de APC circulante reducido es un factor de riesgo independiente de VTE (España F *et al*, 2001). Por ello, medimos los niveles de APC en todos los individuos incluidos en el estudio, excluyendo aquellos bajo tratamiento con anticoagulantes orales. La tabla 4.1.7 muestra los resultados obtenidos. Los niveles plasmáticos de APC estaban significativamente reducidos en los 68 propósitos (1,12±0,24 ng/ml) comparado con los 149 familiares asintomáticos (1,19±0,25 ng/ml) ($P=0,046$), mientras que los niveles antigénicos de proteína C eran similares en ambos grupos (106±25% vs 104±19% respectivamente) ($P=0,519$).

TABLA 4.1.4.1. NIVELES PLASMÁTICOS DE APC Y PROTEÍNA C EN LOS 217 PORTADORES DE LA MUTACIÓN 20210A DEL GEN DE LA PROTROMBINA.

PARÁMETRO	PROPÓSITOS (N=68)	FAMILIARES ASINTOMÁTICOS (N=149)	P
Proteína C antigénica (%)	106 ± 25	104 ± 19	0,519
APC (ng/ml) TODOS	1,12 ± 0,24	1,19 ± 0,25	0,046
Portadores genotipo 4600AA	1,19 ± 0,25		0,003
Portadores genotipo 4600AG+GG	1,05 ± 0,24		

Los valores son expresados como media ± DE.

Además, al distribuir todos los individuos portadores de la mutación 20210A según el polimorfismo 4600A/G en el gen del EPCR, los niveles de APC eran significativamente menores en los 42 individuos portadores del alelo 4600G (1,05±0,24 ng/ml), que en los 175 portadores del alelo 4600A (1,19±0,25 ng/ml) ($P=0,003$).

4.2. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO 1418C/T DEL GEN DE LA TROMBOMODULINA, NIVELES PLASMÁTICOS DE PROTEÍNA C ACTIVADA Y TROMBOMODULINA SOLUBLE SOBRE EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO

La trombomodulina (TM) cataliza la activación de la proteína C mediada por trombina. Así, alteraciones en el gen de la TM, podrían dar lugar a la formación de una molécula disfuncional, o a la disminución de la expresión de TM, y con ello causar un estado protrombótico. Se han descrito diferentes mutaciones en el gen de la TM, algunas de las cuales se han asociado con la trombosis venosa y/o arterial (Glaser CB et al, 1992; Clarke JH et al, 1992; Norlund L et al, 1997a & 1997b & 1999; Doggen CJ et al, 1998b; Le Flem L et al, 1998; Li YH et al, 2000 & 2001 & 2002; Kunz G et al, 2002; Park HY et al, 2002; Öhlin A et al, 2004; Heit JA et al, 2005; Kubisz P et al, 2005; Auro K et al, 2006; Sugiyama S et al, 2006).

El polimorfismo 1418C/T en el gen de la TM induce el cambio de aminoácido de Alanina a Valina en el residuo 455 de la proteína, quedando localizado en el sexto dominio tipo EGF contiguo al sitio de unión a la trombina. La proximidad de esta mutación a una zona importante para la acción de la TM sugiere que la mutación Ala455Val podría modular la activación de la proteína C sobre la membrana de la célula endotelial vía el complejo trombina-TM y, por tanto, modificar el riesgo de trombosis. De hecho, varios estudios analizaron el efecto de este polimorfismo sobre el riesgo de trombosis, tanto venosa como arterial, pero los resultados fueron contradictorios (van der Velden PA *et al*, 1991; Öhlin A & Marlar R, 1995; Öhlin A *et al*, 1997; Norlund L *et al*, 1997a & 1997b; Ireland H *et al*, 1997; Nakazawa F *et al*, 1999; Wu KK *et al*, 2001; Medina P *et al*, 2001; Thude H *et al*, 2002; Faioni EM *et al*, 2002; Aleksic N *et al*, 2002).

Así, quisimos analizar la asociación de este polimorfismo con el riesgo de VTE estudiando un amplio grupo de pacientes con VTE y otro de controles sanos. Además de genotipar en todos ellos el polimorfismo 1418C/T en el gen de la TM, en un subgrupo cuantificamos los niveles plasmáticos de TM soluble (sTM) y de APC. También analizamos la funcionalidad de este polimorfismo mediante cultivos de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) en función del genotipo para este polimorfismo. Para ello, cuantificamos los niveles de TM presentes en el sobrenadante o medio de cultivo, extrapolables a los niveles de sTM circulante en plasma, y en el lisado celular de estos cultivos, extrapolables a los niveles de TM presentes en la membrana celular.

4.2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON TROMBOSIS Y CONTROLES SANOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

La tabla 4.2.1 muestra los datos demográficos y clínicos de los individuos incluidos en el estudio. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de 1.173 pacientes con historia de VTE y el grupo de 1.262 sujetos sanos sin historia de enfermedad vascular o trombótica.

TABLA 4.2.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE PACIENTES Y CONTROLES.

	PACIENTES	CONTROLES	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (P)
N	1.173	1.262	
Edad: mediana (percentiles 10-90)	45 (26-67)	44 (25-68)	0,389
Hombres, N (%)	613 (52)	657 (52)	0,954
Embolismo pulmonar, N (%)	267 (23)	-	
Trombosis recurrente, N (%)	281 (24)	-	
Trombosis familiar, N (%)	258 (22)	-	
Trombosis espontánea*, N (%)	375 (32)	-	
Factor V Leiden, N (%)			
- / -	997 (85)	1.229 (97)	
+ / - & + / +	173 & 3 (15)	33 & 0 (3)	< 0,001
PT G20210A, N (%)			
GG	1.060 (90)	1.213 (96)	
GA & AA	105 & 8 (10)	49 & 0 (4)	< 0,001

* No se incluyen pacientes con factores de riesgo circunstanciales (embarazo, trauma, cirugía, inmovilización, anticonceptivos orales).

La mediana de edad y distribución por sexos fue similar en ambos grupos. El 76% de los pacientes sufrió un único evento trombótico, y el 22% tenía una historia familiar de trombosis. Sin embargo, la prevalencia de los clásicos polimorfismos protrombóticos era mayor en el grupo de pacientes, y similar a la descrita en otras series. El factor V Leiden estaba presente en 173 pacientes (15%) (3 homocigotos), y el alelo 20210A de la protrombina se identificó en 105 pacientes (10%) (8 homocigotos).

4.2.2. GENOTIPADO DE LAS MUESTRAS PARA EL POLIMORFISMO 1418C/T EN EL GEN DE LA TROMBOMODULINA

La detección del polimorfismo 1418C/T en el gen de la TM, que predice el cambio de aminoácido de Alanina a Valina en el residuo 455, situado en el sexto

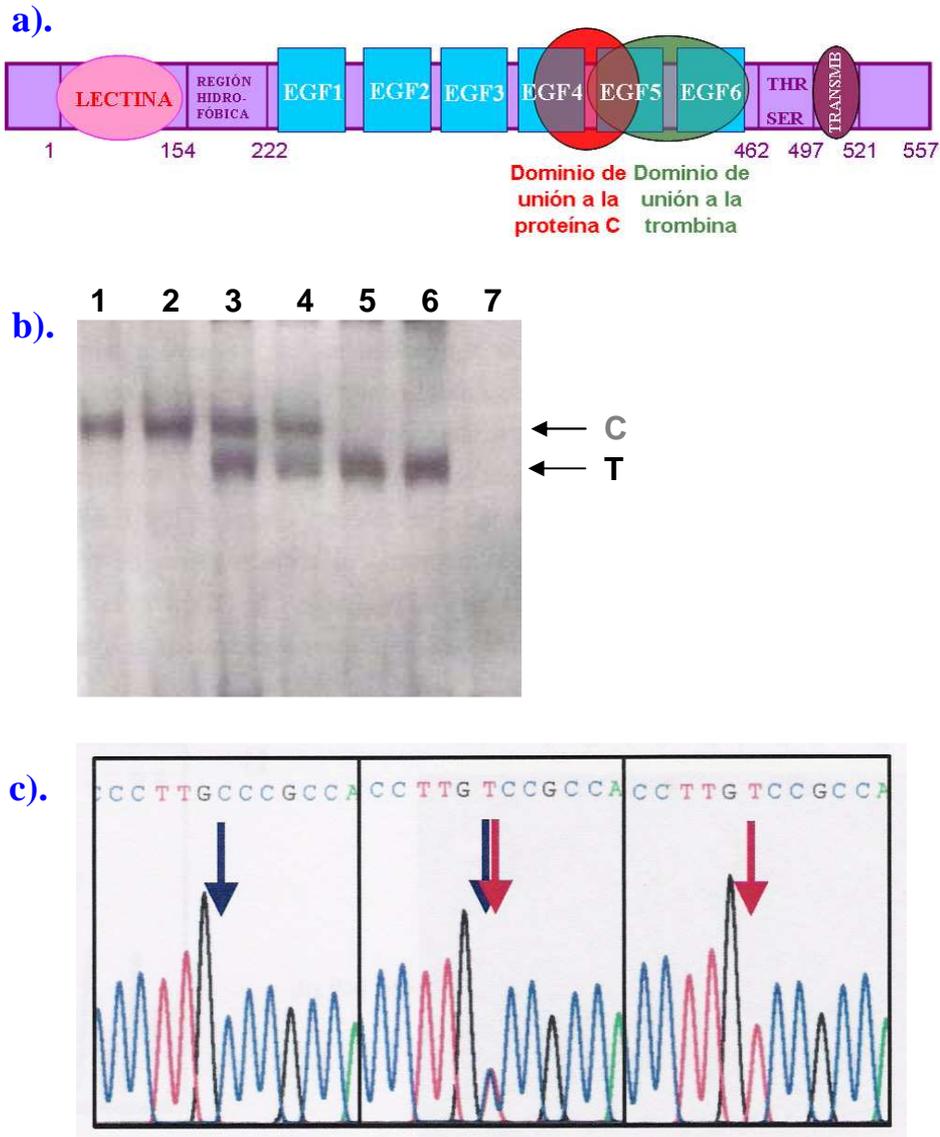
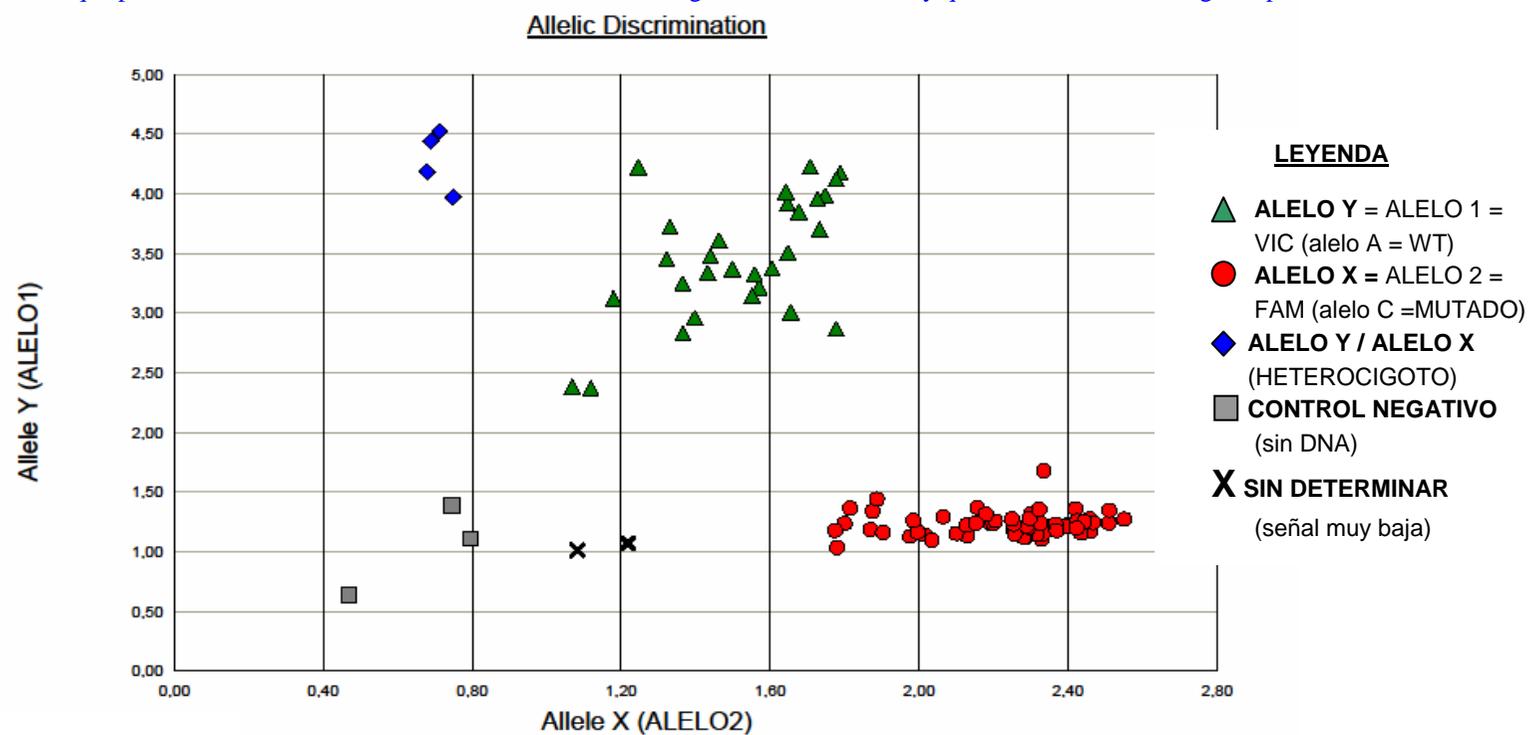


FIGURA 4.2.2.1. Genotipado del polimorfismo 1418C/T en el gen de la TM. A: Esquema de la molécula de TM, mostrando sus diferentes regiones. B: Resultado del genotipado mediante SSCP. Los pocillos 1 y 2 contienen muestras con el genotipo CC. Los pocillos 3 y 4 contienen muestras con el genotipo CT. Y los pocillos 5 y 6 contienen muestras con el genotipo TT. El pocillo 7 contiene, como control, una muestra amplificada sin desnaturizar. **C: Resultado del genotipado mediante secuenciación directa.** El primer cromatograma corresponde a una muestra con genotipo normal CC, el segundo corresponde a una muestra heterocigota CT y el tercero corresponde a una muestra con genotipo homocigoto TT.

FIGURA 4.2.2.2. Genotipado del polimorfismo 2729A/C en la región 3' no traducible del gen de la trombomodulina. Gráfica resultante tras la transformación de la fluorescencia emitida por cada muestra en un valor de fluorescencia dentro de un eje de coordenadas X/Y, que permitirá la discriminación alélica de cada muestra según sus coordenadas, y que asociaremos a cada genotipo.



dominio tipo EGF del gen de la TM, se determinó en un primer momento mediante análisis por SSCPs y por secuenciación directa de las muestras que mostraban una alteración, puesto que la presencia de la mutación no modifica ni genera ninguna diana de restricción (FIGURAS 4.2.2.1 b y c respectivamente).

Ya iniciado el presente estudio, fue descrita la existencia de un completo desequilibrio de unión ($r^2 > 0,9$) entre los polimorfismos 1418C/T (rs1042579) y 2729A/C (rs3176123) en el gen de la TM, este último localizado en la región 3' no traducible del gen (Sugiyama S *et al*, 2006; Auro K *et al*, 2006). A diferencia del polimorfismo 1418C/T, el polimorfismo 2729A/C permite el diseño de sondas y cebadores que hacen posible su análisis mediante un ensayo de alto rendimiento. Así, utilizamos el polimorfismo 2729A/C en lugar del polimorfismo 1418C/T para el genotipado de las muestras procedentes de los otros hospitales participantes y una parte de las muestras procedentes de nuestro hospital. Sin embargo, al presentar los resultados seguiremos refiriéndonos en todos los casos al polimorfismo 1418C/T. El genotipado del polimorfismo 2729A/C se llevó a cabo mediante ensayo TaqMan o 5' nucleasa.

En la figura 4.2.2.2 se muestran los resultados obtenidos tras la lectura a punto final de una placa de 96 pocillos en el sistema *ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System*.

4.2.3. ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO C1418T DEL GEN DE LA TROMBOMODULINA CON EL RIESGO DE TROMBOSIS

La tabla 4.2.3.1 muestra la distribución de genotipos para el polimorfismo C1418T en el gen de la TM en pacientes y controles. La frecuencia del alelo 1418T era mayor en controles que en pacientes ($P < 0,001$). Además, la frecuencia del genotipo 1418TT fue 1,8% en pacientes frente un 2,9% en controles.

El análisis de regresión logística mostró que tanto la presencia del alelo 1418T (OR=0,71; IC 95%=0,60-0,86) como la del genotipo 1418TT (OR=0,56; IC 95%=0,32-0,96) estaban significativamente asociados con una reducción del riesgo de trombosis. El ajuste para edad, sexo, y la presencia de los principales defectos trombofílicos no modificó significativamente las ORs. Cuando los pacientes y controles se agruparon de acuerdo con el sexo, no se observaron diferencias significativas en el riesgo de VTE en ningún caso.

TABLA 4.2.3.1. DISTRIBUCIÓN DEL GENOTIPO C1418T EN EL GEN DE LA TROMBOMODULINA EN PACIENTES CON VTE Y CONTROLES SANOS.

TM C1418T	PACIENTES	CONTROLES	Odds Ratio (IC 95%)	
	n (%)	n (%)	CRUDO	AJUSTADO
TODOS				
CC	875 (74,6)	857 (67,9)	1*	1*
CT	277 (23,6)	368 (29,2)	0,74 (0,61-0,88)	0,77 (0,63-0,93)†
TT	21 (1,8)	37 (2,9)	0,56 (0,32-0,96)	0,55 (0,31-0,97)†
CT & TT	286 (24,4)	405 (32,1)	0,72 (0,60-0,86)	0,75 (0,62-0,90)†
HOMBRES				
CC	453 (73,9)	455 (69,3)	1*	1*
CT	153 (25,0)	186 (28,3)	0,83 (0,64-1,06)	0,82 (0,64-1,06)&
TT	7 (1,1)	16 (2,4)	0,44 (0,18-1,08)	0,45 (0,17-1,12)&
CT & TT	160 (26,1)	202 (30,7)	0,80 (0,62-1,02)	0,84 (0,65-1,09)&
MUJERES				
CC	422 (75,4)	402 (66,4)	1*	1*
CT	124 (22,1)	182 (30,1)	0,65 (0,50-0,85)	0,66 (0,50-0,87)&
TT	14 (2,5)	21 (3,5)	0,63 (0,32-1,27)	0,65 (0,32-1,32)&
CT & TT	138 (24,6)	203 (33,6)	0,65 (0,50-0,84)	0,66 (0,51-0,87)&

* Grupo de referencia.

† Análisis multivariante, ajustado para edad, sexo, y presencia de defectos trombofílicos (FV Leiden, PT 20210A, deficiencias de proteína C, proteína S o antitrombina).

& Análisis multivariante, ajustado para edad y presencia de defectos trombofílicos (FV Leiden, PT 20210A, deficiencias de proteína C, proteína S o antitrombina).

4.2.4. NIVELES DE TROMBOMODULINA SOLUBLE, PROTEÍNA C ACTIVADA Y RIESGO DE TROMBOSIS

Con el fin de investigar el mecanismo por el cual el polimorfismo 1418C/T en el gen de la TM se asociaba con el riesgo de VTE, determinamos los niveles de sTM y de APC en un subgrupo de 366 pacientes y 451 controles de los que disponíamos de muestra plasmática adecuada para la determinación del APC circulante.

Los niveles de sTM estaban significativamente más elevados en el grupo de pacientes (4,08 ng/ml; 3,25-5,77) que en el de controles (3,86 ng/ml; 2,84-5,15) (P<0,001) (TABLA 4.2.3). Además, cuando los niveles de sTM se distribuyeron de acuerdo con el genotipo para el polimorfismo 1418C/T del gen de la TM, tanto en controles como en pacientes, se observó que los individuos portadores del genotipo

TT tenían niveles de sTM significativamente reducidos comparado con los del genotipo CC ($P < 0,001$ en ambos casos) (FIGURA 4.2.3).

TABLA 4.2.3. NIVELES DE sTM Y APC EN PACIENTES CON VTE Y SIN ANTICOAGULACIÓN ORAL Y CONTROLES SANOS, SEGÚN EL GENOTIPO PARA EL POLIMORFISMO 1418C/T EN EL GEN DE LA TM.

POLIMORFISMO TM 1418C/T	sTM (ng/ml)				
	PACIENTES		CONTROLES		P
	N	Mediana (percentiles 90-10)	N	Mediana (percentiles 90-10)	
TODOS	366	4,08 (3,25-5,77)	451	3,86 (2,84-5,15)	<0,001
Genotipo CC	288	4,20 (3,25-5,77)	293	4,05 (2,99-5,27)	0,006
Genotipo CT	73	3,75 (3,12-4,69)	138	3,68 (2,73-4,75)	0,7073
Genotipo TT	6	3,39 (2,47-3,71)	20	2,99 (2,07-3,74)	0,4467
K-W test	$P < 0,001$		$P < 0,001$		
POLIMORFISMO TM 1418C/T	APC (ng/ml)				
	PACIENTES		CONTROLES		P
	N	media \pm DE	N	media \pm DE	
TODOS	366	1,03 \pm 0,39	451	1,27 \pm 0,41	<0,001
Genotipo CC	288	1,03 \pm 0,40	293	1,25 \pm 0,40	<0,001
Genotipo CT	73	1,02 \pm 0,35	138	1,31 \pm 0,43	<0,001
Genotipo TT	6	1,30 \pm 0,34	20	1,38 \pm 0,45	0,661
K-W test	$P = 0,225$		$P = 0,173$		

Los niveles de APC circulante estaban significativamente reducidos en el grupo de pacientes ($1,03 \pm 0,39$ ng/ml) comparado con el de los controles ($1,27 \pm 0,41$ ng/ml) ($P < 0,001$) (TABLA 4.2.3), como ya había sido descrito previamente por nuestro grupo en otra serie de pacientes y controles (España F *et al*, 2001 & 2002b; Medina P *et al*, 2004 & 2005). Además, tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control se observó una tendencia a mayores niveles de APC conforme aumentaba el número de alelos 1418T presentes ($P = 0,225$ y $P = 0,173$ respectivamente) (FIGURA 4.2.3), aunque las diferencias no alcanzaron una significación estadística. Así los individuos portadores del genotipo TT tenían mayores niveles de APC comparado con los del genotipo CC.

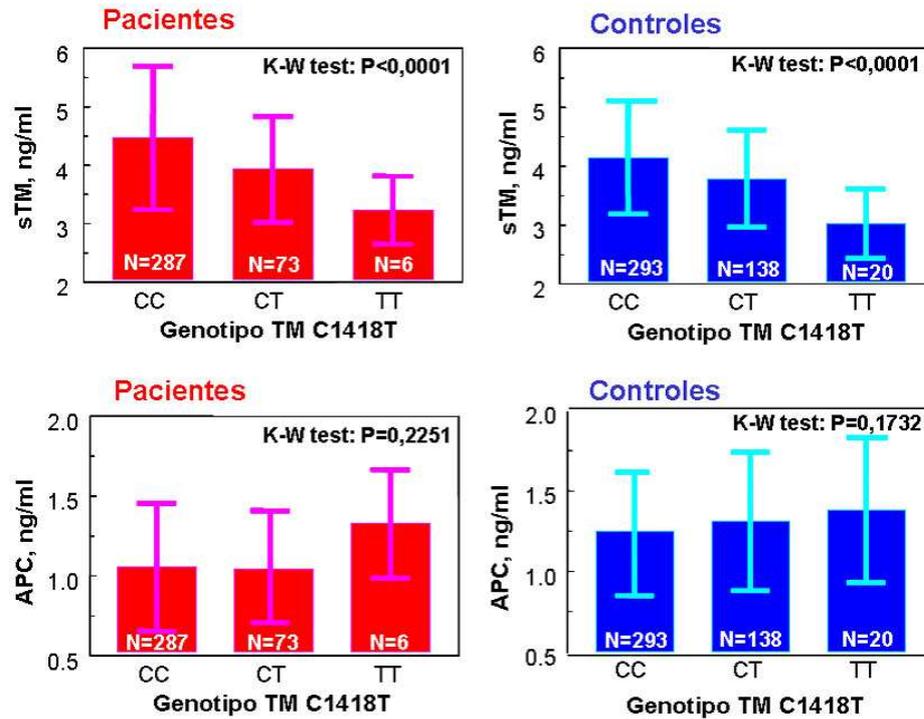


FIGURA 4.2.3. Niveles de TM soluble y proteína C activada en pacientes con TEV y controles de acuerdo con el genotipo para el polimorfismo 1418C/T en el gen de la trombomodulina.

4.2.5. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DEL POLIMORFISMO 1418C/T EN EL GEN DE LA TROMBOMODULINA EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE VENA UMBILICAL HUMANA (HUVECs)

Con el fin de valorar la funcionalidad del polimorfismo 1418C/T en el gen de la TM, cuantificamos los niveles de TM en el medio de cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) y en la fracción de membrana de estas células procedentes de 68 cordones umbilicales humanos, asociando después estos resultados con los diferentes genotipos obtenidos para estas células (FIGURA 4.2.4).

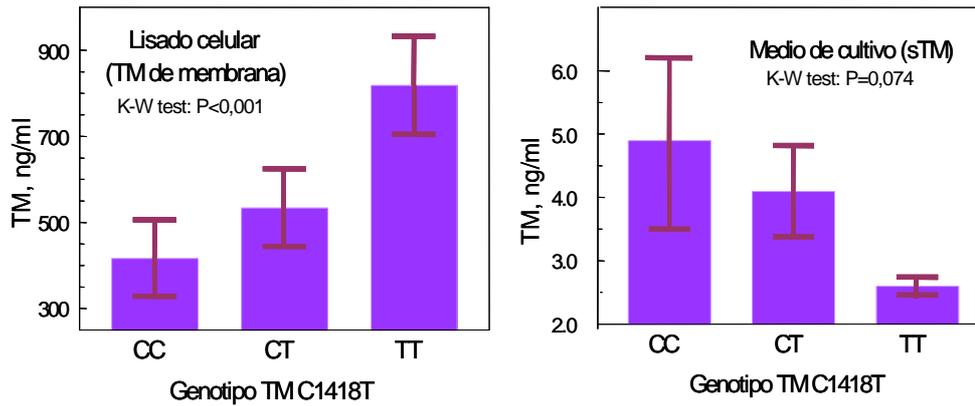


FIGURA 4.2.4. Niveles de trombomodulina en la fracción de membrana y en el medio de cultivo de HUVECs de acuerdo con el genotipo para el polimorfismo 1418C/T en el gen de la trombomodulina.

El nivel de TM en la fracción de membrana o lisado celular, extrapolable a la TM presente *in vivo* en la membrana celular y con actividad de cofactor de la trombina para activar a la proteína C, aumentó al aumentar el número de alelos 1418T presentes ($P<0,001$), mientras que el nivel de TM en el medio de cultivo o sobrenadante de HUVECs, extrapolable a la sTM circulante en plasma, tendió a disminuir al aumentar el número de alelos 1418T presentes ($P=0,074$).

4.3. IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA GLUCOSILCERAMIDA SINTASA (UGCG), Y SU ASOCIACIÓN CON LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GlcCer, APC Y EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO

La vía anticoagulante de la proteína C es modulada por diferentes componentes de la membrana celular, destacando lípidos, glicolípidos y proteínas. La glucosilceramida (GlcCer) es un glicolípido neutro, componente esencial de la mayoría de las membranas celulares, presente también en la circulación con unos niveles plasmáticos que oscilan entre 2 y 10 µg/ml.

En 2001, Deguchi y colaboradores describieron que el nivel plasmático de GlcCer era menor en individuos que habían sufrido un evento trombótico y concluyeron que niveles reducidos de GlcCer en plasma aumentan el riesgo de VTE. Además, mediante estudios *in vitro*, demostraron que la GlcCer funciona como cofactor anticoagulante del complejo APC:PS, estimulando la inhibición del FVa por dicho complejo (Deguchi H *et al*, 2002; Yegneswaran S *et al*, 2003).

Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado la asociación entre niveles reducidos de APC y un aumento del riesgo de VTE (España F *et al*, 2001). Por lo tanto, nos propusimos investigar si existía una interacción entre el efecto de niveles reducidos de GlcCer y de APC. Para ello, determinamos los niveles de GlcCer y APC en un grupo de pacientes con VTE y un grupo de individuos sanos. También analizamos la posible existencia de mutaciones o polimorfismos en el gen de la GlcCer sintasa (UGCG), que sintetiza la enzima responsable de la formación de GlcCer, que pudieran explicar las variaciones en los niveles plasmáticos de GlcCer y su efecto sobre el riesgo de VTE.

4.3.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES Y CONTROLES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

El estudio incluyó 316 pacientes con historia de VTE y 320 controles sanos. La tabla 4.3.1 muestra las características clínicas de los pacientes con VTE y de los sujetos del grupo control. No se encontraron diferencias significativas entre pacientes y controles para ninguno de los parámetros estudiados.

TABLA 4.3.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON TROMBOEMBOLISMO VENOSO Y CONTROLES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.

	PACIENTES	CONTROLES	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (P)
N	316	320	
Edad (años) *	40 (24-61)	40 (24-59)	0,233
Edad en el momento del VTE (años) *	37 (21-58)	-	-
Hombres, N (%)	152 (48,1)	141 (44,1)	1,000
Embolismo pulmonar, N (%)	43 (13,9)	-	-
Trombosis recurrente, N (%)	35 (11,8)	-	-
Trombosis familiar, N (%)	71 (25)	-	-
Trombosis espontánea*, N (%)	109 (42,7)	-	-
Defectos genéticos:			
Ninguno, N (%)	259 (85,8)	294 (91,9)	0,001
Factor V Leiden, N (%)	22 (7,3)	7 (2,2)	0,001
PT 20210A, N (%)	12 (4,0)	14 (4,4)	0,842
Deficiencia PC, N (%)	7 (2,3)	4 (1,3)	0,381
Deficiencia PS, N (%)	1 (0,3)	0	0,497
Deficiencia AT, N (%)	1 (0,3)	0	0,497
Deficiencia plasminógeno, N (%)	0	1 (0,3)	1,000

* Datos expresados como mediana y rango (percentiles 10-90)

4.3.2. NIVELES DE GlcCer Y APC, Y RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO

Para comprobar la hipótesis de una interacción entre niveles plasmáticos reducidos de GlcCer y niveles plasmáticos reducidos de APC sobre el riesgo de VTE, analizamos dichos niveles en un grupo de 316 pacientes con historia de VTE, y en un grupo control de 320 individuos sanos con similar distribución de edad y sexo al de los pacientes. Se excluyeron aquellos pacientes bajo tratamiento con anticoagulantes orales o mujeres que estuvieran tomando anticonceptivos orales o estuviesen embarazadas. Tampoco se incluyeron individuos con tumores malignos, síndromes nefróticos, enfermedad renal o hepática, enfermedades inflamatorias o infecciosas, o lupus eritematoso. Excluyendo así todas aquellas situaciones que pudieran alterar *per se* los niveles plasmáticos de GlcCer (Deguchi H *et al*, 2005).

Además, y simultáneamente al análisis de los niveles plasmáticos del glicolípido neutro GlcCer, determinamos los niveles plasmáticos del fosfolípido fosfatidiletanolamina (PE), componente esencial de la membrana plasmática, para comprobar la hipótesis de una interacción entre componentes de la membrana plasmática y la coagulación.

Se observó que tanto los niveles plasmáticos de GcCer como los de APC eran significativamente menores en los pacientes con VTE que en los controles ($5,70 \pm 1,32 \mu\text{g/ml}$ vs. $6,07 \pm 1,25 \mu\text{g/ml}$; $P=0,005$ y $1,03 \pm 0,42 \text{ ng/ml}$ vs. $1,24 \pm 0,41 \text{ ng/ml}$; $P<0,001$ respectivamente). Sin embargo no encontramos diferencias significativas en los niveles plasmáticos del fosfolípido PE entre el grupo de pacientes con VTE y el de controles ($47,39 \pm 0,84 \mu\text{g/ml}$ VTE vs $46,38 \pm 0,75 \mu\text{g/ml}$ controles) ($P=0,38$).

En la figura 4.3.2.2 se muestra la distribución de los niveles de GlcCer en pacientes con VTE y en controles. Estableciendo como punto de corte el percentil 10 del grupo control ($4,35 \mu\text{g/ml}$), el 19% de los pacientes con VTE frente al 10% de los individuos control tenían niveles de GlcCer por debajo de este valor. El OR calculado para niveles de GlcCer por debajo de este punto de corte fue 2,1 (IC 95%= 1,1-4,1). Al realizar el análisis en función del sexo y edad de los individuos estudiados, el OR no mostró diferencias.

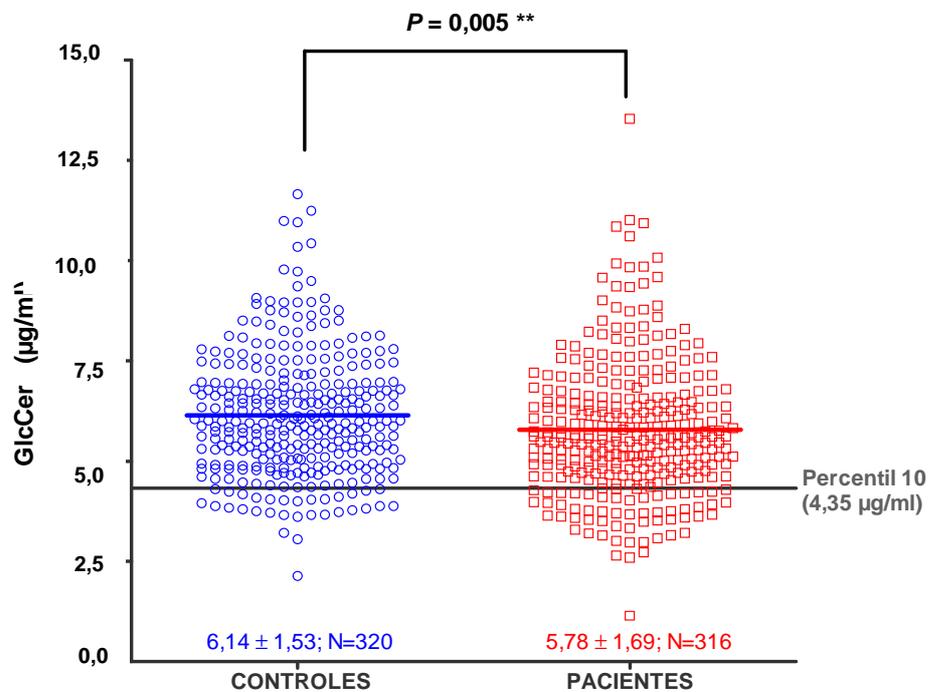


Figura 4.3.2.2. Distribución de los niveles plasmáticos de GlcCer en pacientes y controles.

Para analizar la posible interacción de deficiencias simultáneas de APC y de GlcCer, estratificamos los 316 pacientes y 320 controles en 9 subgrupos de acuerdo con los tertiles para los niveles plasmáticos de APC y GlcCer. (FIGURA 4.3.2.3). Tomando como referencia el subgrupo con los niveles más altos de APC y de GlcCer simultáneamente (OR=1), el OR para el subgrupo con el tercil de GlcCer más bajo y el tercil de APC más alto era 2,1 (CI 95%=1,0-4,6), mientras que el OR

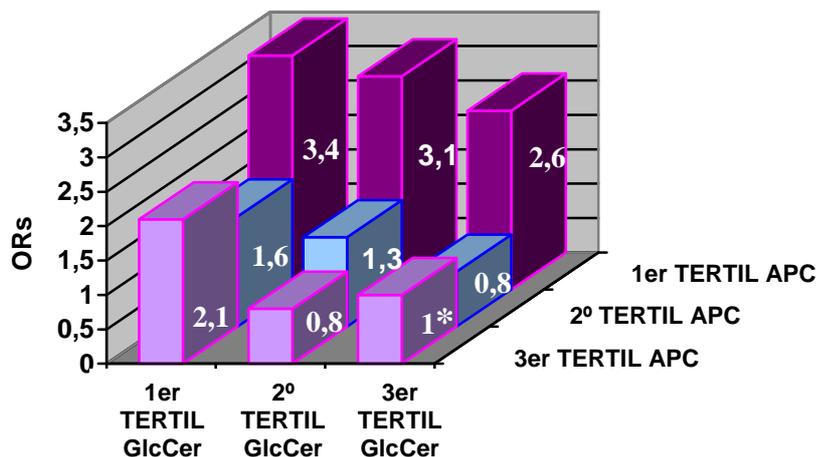


Figura 4.3.2.3. Riesgo de TEV calculado a partir del análisis de los tertiles para los niveles plasmáticos de GlcCer y APC. Los 636 sujetos estudiados (316 pacientes y 320 controles) se estratificaron en 9 subgrupos, según los tertiles para los niveles de GlcCer y APC, y se calculó el riesgo de TEV para cada subgrupo, mostrado en la figura el OR resultante tras comparación con el subgrupo de referencia, compuesto por el tercil más alto de APC y GlcCer.

* Grupo de referencia

para el subgrupo con el tercil de APC más bajo y el tercil GlcCer más alto era 2,6 (CI 95%=1,29-5,26). Además, el OR para el subgrupo con los tertiles más bajos tanto para la APC como la GlcCer era 3,4 (IC 95%=1,7-6,5).

4.3.3. IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA GLUCOSILCERAMIDA SINTASA (UGCG)

Nuestro objetivo fue identificar la presencia de mutaciones en el gen de la UGCG con el fin de valorar su asociación con los niveles plasmáticos de GlcCer y con el riesgo de VTE. Para ello, seleccionamos 34 individuos que tenían un nivel

muy reducido de GlcCer circulante con el fin de aumentar la probabilidad de encontrar mutaciones que modificaran los niveles plasmáticos de este glicolípido. En todos ellos analizamos, mediante secuenciación directa, los fragmentos amplificados que contienen cada uno de los 9 exones que componen el gen junto a las correspondientes regiones intrónicas flanqueante y regiones 5' y 3' UTR, determinando la presencia de mutaciones mediante inspección visual.

En la tabla 4.3.3.1 se muestra de forma resumida las mutaciones identificadas en el gen de la UGCG, su localización en el gen, el tipo de mutación y la frecuencia para cada genotipo.

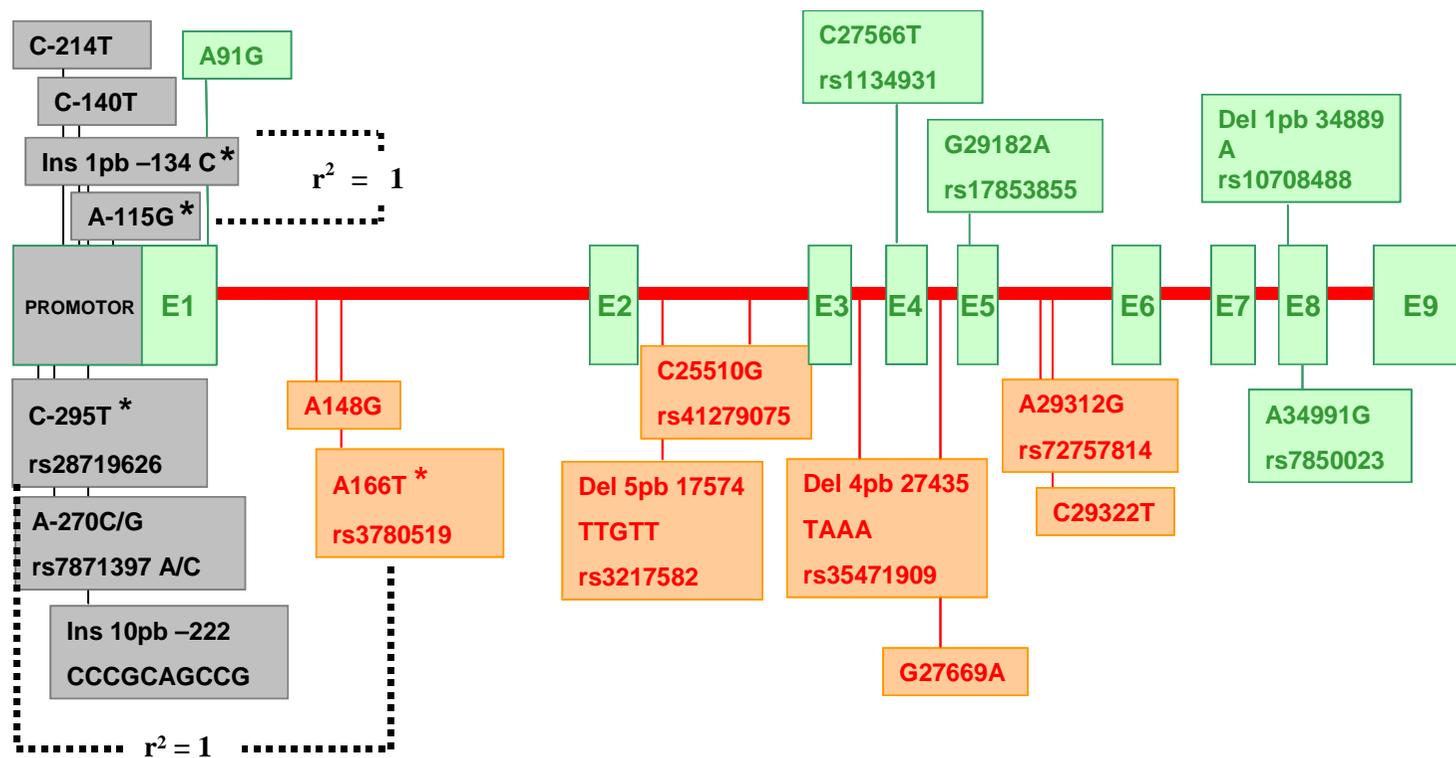
TABLA 4.3.3.1. MUTACIONES IDENTIFICADAS EN EL GEN DE LA UGCG.

Posición	Localización	MUTACION		Frecuencia (nº casos)
-295	5'UTR	C>T	rs28719626	18 CC + 15 CT + 1 TT
-270	5'UTR	A>C / G	rs7871397	18 AA + 15 AG + 1 GG
-222	5'UTR	Ins 10 pb: CCCCGAGCCG	no descrita	22 wt + 8 heterocigotos + 4 homocigotos
-214	5'UTR	C>T	no descrita	32 CC + 2 CT
-140	5'UTR	C>T	no descrita	34 CC
-134	5'UTR	Ins 1 pb: C	no descrita	34 wt
-115	5'UTR	A>G	no descrita	34 AA
91	Intron 1	A>G	no descrita	34 AA
148	Intron 1	A>G	no descrita	19 AA + 15 AG
166	Intron 1	A>T	rs3780519	18 AA + 15 AT + 1 TT
17574	Intron 2	Del 5 pb: TTGTT	rs3217582	16 wt + 15 heterocigotos + 3 homocigotos
25510	Intron 2	C>G	rs41279075	32 CC + 2 CG
27435	Intrón 3	Del 4 pb: TAAA	rs35471909	22 wt + 10 heterocigotos + 2 homocigotos
27566	Exón 4	C>T; Gly116Gly	rs1134931	31 CC + 3 CT
27669	Intrón 4	G>A	no descrita	32 GG + 1 GA + 1 AA
29182	Exón 5	G>A; Thr153Thr	rs17853855	34 GG
29312	Intrón 5	A>G	rs72757814	23 AA + 11 AG
29322	Intrón 5	C>T	no descrita	33 CC + 1 CT
34889	Intrón 7	Del 1 pb: A	rs10708488	34 wt
34991	Exón 8	A>G; Thr287Thr	rs7850023	21 AA + 11 AG + 2 GG

(Posición de acuerdo con la secuencia AL442066, tomando como inicio de la transcripción el codon ATG en posición 8046).

Última actualización realizada en Octubre de 2009.

Encontramos 20 mutaciones, distribuidas en la región promotora 5'UTR, intrón (I) 1, I2, I3, exón (E) 4, I4, E5, I5, I7 y E8, de las cuales 9 no habían sido



* EN COMPLETO DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

FIGURA 4.3.3.1. Mutaciones identificadas en el gen de la glucosilceramida sintasa. Numeración de acuerdo con la secuencia de referencia AI442066, tomando como punto de inicio de la transcripción el codon ATG en posición 8046.

TABLA 4.3.3.2. FRECUENCIA Y NIVELES DE GlcCer ASOCIADOS A LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS EN EL GEN DE LA UGCG.

Posición	Localización	Mutación	wt		heterocigoto		homocigoto		
			frecuencia	GlcCer (ug/ml)	frecuencia	GlcCer (ug/ml)	frecuencia	GlcCer (ug/ml)	
-295	5'UTR	C>T	18/34	3,557	15/34	4,238	1/34	1,14	
-270	5'UTR	A>C / G	18/34	3,557	15/34	4,238	1/34	1,14	*
-222	5'UTR	Ins 10 pb: CCCGCAGCCG	22/34	3,541	8/34	3,998	4/34	4,19	*
-214	5'UTR	C>T	32/34	3,668	2/34	4,825	-	-	
-140	5'UTR	C>T	34	3,742	-	-	-	-	
-134	5'UTR	Ins 1 pb: C	34	3,742	-	-	-	-	
-115	5'UTR	A>G	34	3,742	-	-	-	-	
91	Intron 1	A>G	34	3,742	-	-	-	-	
148	Intron 1	A>G	19/34	3,724	15/34	3,767	-	-	*
166	Intron 1	A>T	18/34	3,557	15/34	4,238	1/34	1,14	*
17574	Intron 2	Del 5 pb: TTGTT	16/34	3,533	15/34	4,068	3/34	3,38	
25510	Intron 2	C>G	32/34	3,781	2/34	2,59	-	-	*
27435	Intrón 3	Del 4 pb: TAAA	22/34	3,557	10/34	4,183	2/34	3,295	
27566	Exón 4	C>T; Gly116Gly	31/34	3,751	3/34	3,61	-	-	*
27669	Intrón 4	G>A	32/34	3,829	2/34	3,57	-	-	
29182	Exón 5	G>A; Thr153Thr	34	3,742	-	-	-	-	*
29312	Intrón 5	A>G	23/34	3,546	11/34	4,154	-	-	*
29322	Intrón 5	C>T	33/34	3,742	1/34	4,15	-	-	*
34889	Intrón 7	Del 1 pb: A	34	3,742	-	-	-	-	
34991	Exón 8	A>G; Thr287Thr	21/34	3,575	11/34	4,097	2/34	3,295	*

* Mutación seleccionada para ampliación del estudio

descritas previamente. En la tabla 4.3.3.1. se resumen las frecuencias genotípicas y localización génica para cada una de las mutaciones identificadas.

De las 20 mutaciones identificadas seleccionamos solo 10 por ser las mutaciones más probables de estar asociadas con los niveles de GlcCer (TABLA 4.3.3.2), en función de la región génica en la que se localizaban, la frecuencia de individuos portadores de la mutación, y los niveles medios de GlcCer asociados a cada genotipo. A continuación, extendimos el genotipado de estas 10 mutaciones a todas las muestras de DNA disponibles de los 316 pacientes con VTE y los 320 controles, con el fin de determinar la frecuencia genotípica de cada una de las mutaciones y poder establecer si son mutaciones asociadas a cambios en los niveles de GlcCer y/o al riesgo de VTE, con el fin de estudiar asociaciones genotipo/fenotipo/enfermedad.

TABLA 4.3.3.3. MUTACIONES SELECCIONADAS PARA LA AMPLIACIÓN DEL ESTUDIO Y MÉTODO DE GENOTIPADO EMPLEADO PARA LA DETECCIÓN DE CADA UNA.

UGCG	MUTACIÓN	MÉTODO de GENOTIPADO
Región promotora 5'UTR	-270 A/C/G	SECUENCIACIÓN DIRECTA
	-222 ins10pb	MINI-SECUENCIACIÓN
Intrón 1	148 A/G	MINI-SECUENCIACIÓN
	166 C/T	MINI-SECUENCIACIÓN
Intrón 2	25510 C/G	MINI-SECUENCIACIÓN
Exón 4	27566 C/T	SECUENCIACIÓN DIRECTA
Exón 5	29182 G/A	SECUENCIACIÓN DIRECTA
Intrón 5	29312 A/G	Msl I
	29322 C/T	MINI-SECUENCIACIÓN
Exón 8	34991 A/G	MINI-SECUENCIACIÓN

En la tabla 4.3.3.3 incluimos las mutaciones seleccionadas para la ampliación del estudio y el método empleado para su detección, siguiendo el protocolo descrito en el apartado correspondiente de Material y Métodos de la presente Tesis Doctoral. Dependiendo de la naturaleza de la mutación, elegimos el sistema de detección más adecuado. Así, mediante mini-secuenciación

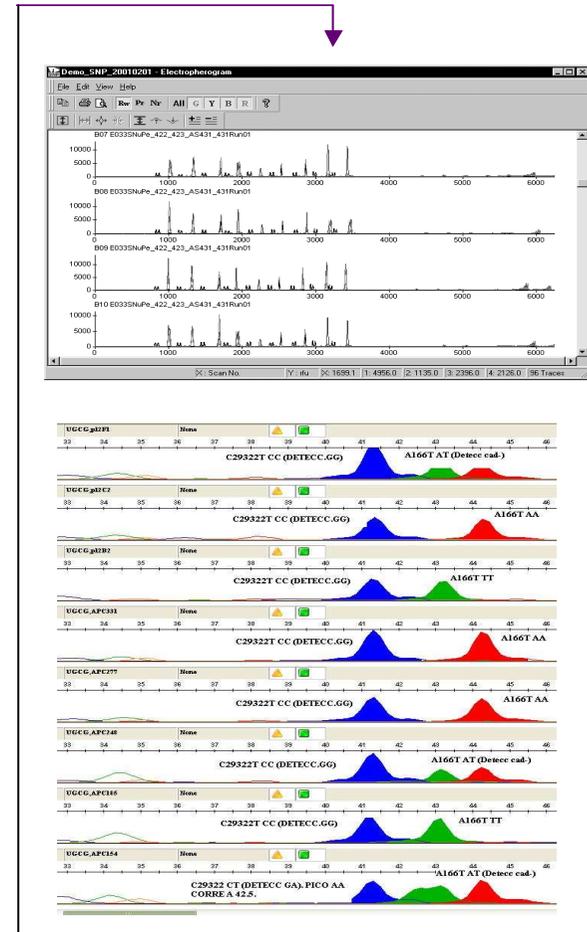
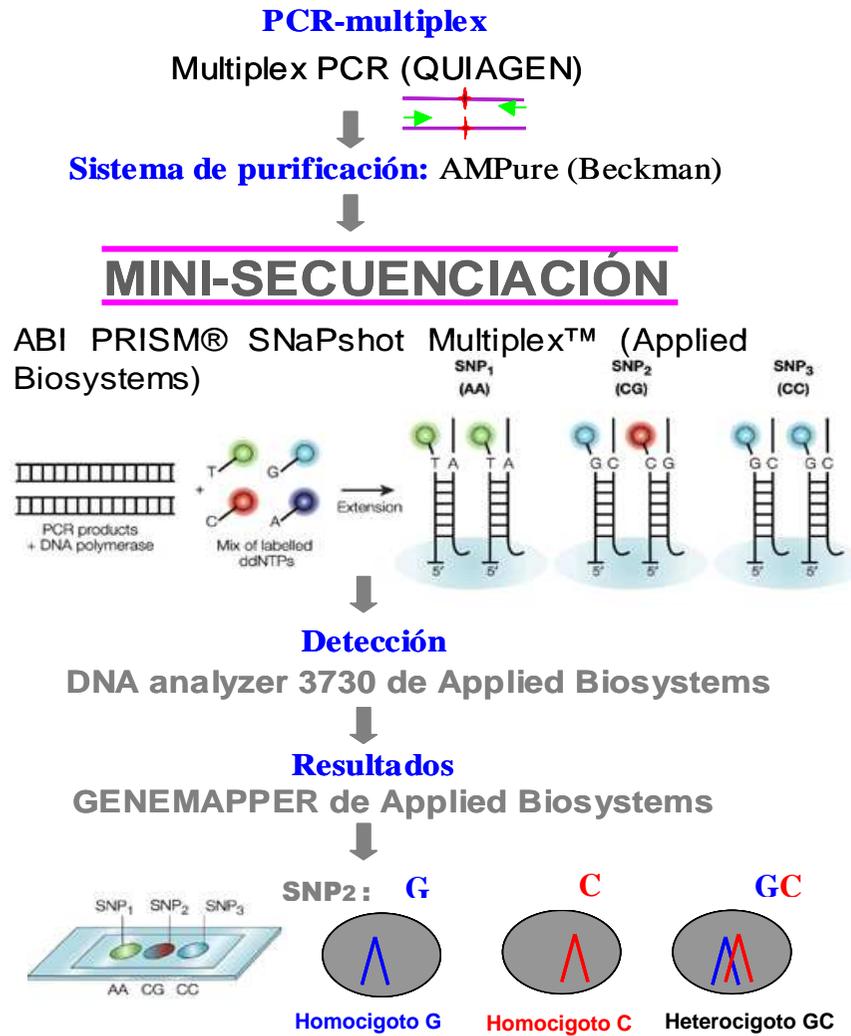


FIGURA 4.3.3.2. Esquema de la Mini-secuenciación.

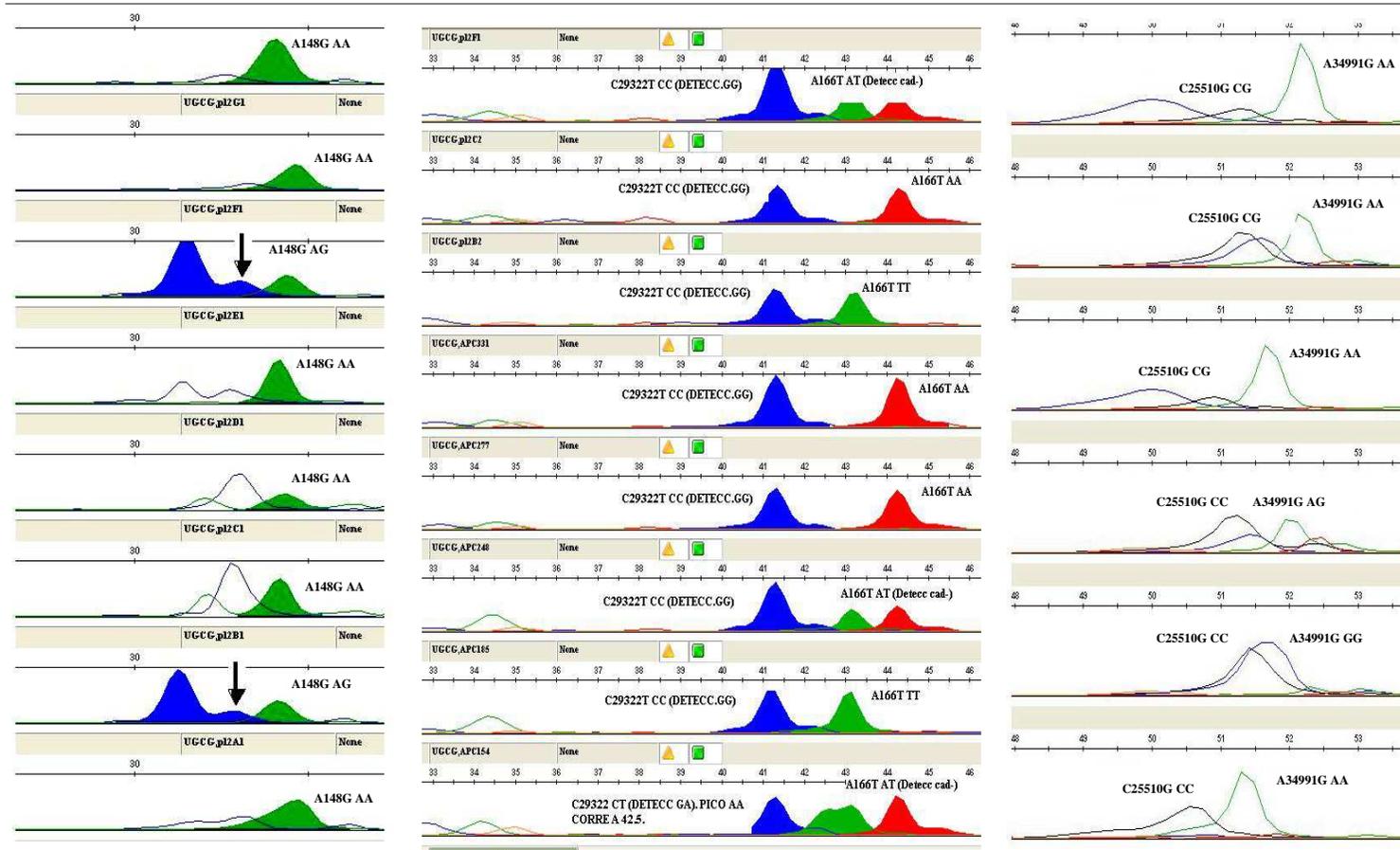


FIGURA 4.3.3.3. Electroferogramas obtenidos tras la electroforesis capilar con los diferentes picos para cada genotipo y polimorfismo.

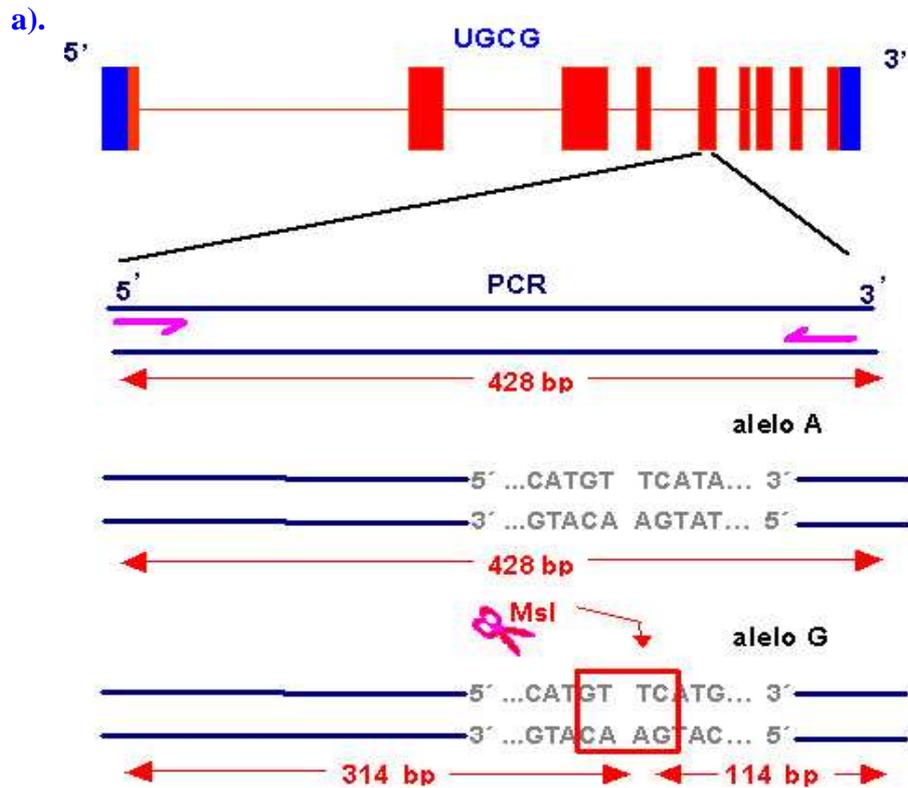
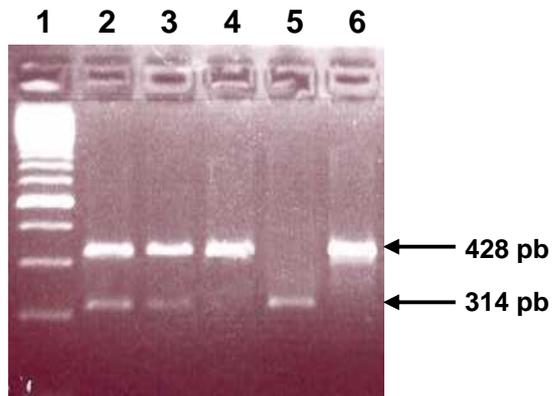


FIGURA 4.3.3.4. Genotipado del polimorfismo A29312G en el intrón 5 del gen de la UGCG mediante análisis de restricción con el enzima Msl I. a). Esquema de la técnica, y b). Gel de agarosa con el resultado de la digestión enzimática del producto de amplificación con Msl I.

b).



El pocillo 1 contiene un marcador de peso molecular de 100 pb. Los pocillos 4 y 6 contienen muestras de genotipo AA, cuyo patrón de bandas es de 428 pb, que corresponde al tamaño del fragmento original de PCR. El pocillo 5 contiene una muestra de genotipo GG, con un patrón de bandas de 314 + 114 pb, producto de la digestión por Msl I. Los pocillos 2 y 3 contienen muestras de genotipo AG, cuyo patrón de bandas es de 428 + 314 + 114 pb. La banda de 114 pb no se detecta en el gel.

genotipamos, en una sola reacción, la inserción de 10pb en posición -222 en la región 5'UTR, las mutaciones A148G y A166T (en completo desequilibrio de unión con la mutación C-295T de la región promotora) en el intrón 1, la mutación C25510G en el intrón 2, la mutación C29322T en el intrón 5, y la mutación A34991G en el exón 8. En las figuras 4.3.3.2 y 4.3.3.3 se muestra un esquema del ensayo de mini-secuenciación y los electroferogramas resultantes, obtenidos tras la electroforesis capilar, con los diferentes picos para cada genotipo y mutación respectivamente.

Mediante la enzima de restricción Msl I determinamos la mutación A29312G en el intrón 5 del gen de la UGCG, ya que la presencia del alelo mutado genera una diana de restricción para este enzima. Así, en presencia del alelo G, el fragmento original de 428 pb da lugar a dos fragmentos de 314 y 114 pb, mientras que en presencia del alelo A la enzima no reconoce ninguna diana en el fragmento, y se obtiene el fragmento de 428 pb. En la figura 4.3.3.4 se muestran los resultados obtenidos tras la digestión con este enzima del fragmento obtenido por PCR. Con la finalidad de validar los resultados obtenidos mediante el empleo de estas dos técnicas, analizamos un pequeño grupo de muestras mediante secuenciación directa para las regiones que incluyen las mutaciones de interés. En todos los casos, los resultados obtenidos fueron idénticos, demostrando la validez de las técnicas utilizadas.

El resto de mutaciones se determinaron mediante secuenciación directa.

4.3.4. ASOCIACIÓN DE LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS EN EL GEN DE LA UGCG Y LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GlcCer CON EL RIESGO DE TROMBOSIS

Para las 10 mutaciones seleccionadas anteriormente, ampliamos el número de casos y controles inicialmente estudiando a los 316 pacientes con VTE y 320 controles con niveles plasmáticos de GlcCer conocidos que teníamos disponibles. No todos los individuos tenían disponible una muestra de DNA para el estudio genético. Además, en algunas mutaciones no fue necesario caracterizar todas las muestras disponibles para obtener una conclusión. Es por ello que el número de casos estudiados para el análisis genético es diferente para 10 mutaciones analizadas.

Las tablas 4.3.4.1 a 4.3.4.6 muestran los niveles de GlcCer de los individuos del grupo control de acuerdo con el genotipo para cada una de las 10 mutaciones

seleccionadas, mientras que las tablas 4.3.4.7 a 4.3.4.12 muestran las frecuencias genotípicas obtenidas para cada una de las mutaciones estudiadas en el grupo de pacientes con VTE y controles, y el OR estimado a partir del análisis de regresión logística.

El polimorfismo A-270C (rs7871397) produce un cambio de base trialélico, habiendo identificado todas las combinaciones de genotipos posibles. Sin embargo, en ningún caso encontramos una clara asociación entre genotipo, niveles de GlcCer y riesgo de VTE (TABLAS 4.3.4.1 y 4.3.4.7).

TABLA 4.3.4.1. NIVELES DE GlcCer EN EL GRUPO CONTROL Y FRECUENCIAS GENOTÍPICAS PARA LAS MUTACIONES ESTUDIADAS EN LA REGIÓN 5'UTR DEL GEN DE LA UGCG.

LOCALIZACIÓN	MUTACIÓN	CONTROLES N (frecuencia)		GlcCer (ug/ml)	P
PROMOTOR 5'UTR	A -270 C / G	137		6,25 ± 1,71	
	AA	54	0,39	6,12 ± 1,81	0,735
	AC	8	0,06	5,69 ± 1,31	
	AG	58	0,42	6,4 ± 1,76	
	CG	6	0,04	6,08 ± 0,60	
	CC	0	0,00	-	
	GG	11	0,08	6,54 ± 1,60	
	ins.10pb -222	255		6,16 ± 1,53	
	- / -	159	0,62	6,13 ± 1,52	0,095
	- / +	79	0,31	6,07 ± 1,54	
+ / +	17	0,07	6,89 ± 1,61		

Valores de GlcCer expresados como media ± DE (µg/ml).

N: tamaño muestral; GlcCer: glucosilceramida; P significación estadística.

TABLA 4.3.4.7. FRECUENCIAS DE LAS MUTACIONES ESTUDIADAS EN LA REGIÓN 5'UTR DEL GEN DE LA UGCG EN PACIENTES Y CONTROLES.

LOCALIZACIÓN	MUTACIÓN	PACIENTES N (frecuencia)		CONTROLES N (frecuencia)		OR (IC 95%)	P
PROMOTOR 5'UTR	A -270 C / G	112		137			
	AA	46	0,41	54	0,39	1*	
	AC	10	0,09	8	0,06	1,217 (0,437-3,395)	0,794
	AG	46	0,41	58	0,42	1,050 (0,612-1,803)	0,891
	CG	3	0,03	6	0,04	0,684 (0,163-2,883)	0,734
	CC	1	0,01	0	0,00	4,097 (0,163-102,9)	0,427
	GG	6	0,05	11	0,08	0,747 (0,258-2,167)	0,792
	ins.10pb -222	211		255			
	- / -	126	0,60	159	0,62	1*	
	- / +	78	0,37	79	0,31	1,161 (0,791-1,703)	0,494
+ / +	7	0,03	17	0,07	0,4583 (0,188-1,118)	0,103	

Tomamos como grupo de referencia (*) el genotipo en ausencia de la mutación.

N: tamaño muestral; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; P significación estadística.

Por contra, se observó cierto grado de asociación entre la inserción de 10 pb localizada en la región 5'UTR del gen de la UGCG y niveles aumentados de GlcCer ($P=0,095$), así como una tendencia a menor riesgo de VTE en presencia de la inserción en homocigosis ($OR=0,458$; $IC95\%= 0,188-1,118$; $P=0,103$) (TABLAS 4.3.4.1 y 4.3.4.7).

Las tablas 4.3.4.2 y 4.3.4.8 muestran los resultados obtenidos para las mutaciones seleccionadas en el intrón 1 del gen de la UGCG. No se observó ninguna asociación ni con los niveles de GlcCer ni con el riesgo de VTE para los polimorfismo A148G y A166T (rs3780519), este último en completo desequilibrio de unión con el polimorfismo C-295T (rs28719626) identificado en la región 5'UTR.

TABLA 4.3.4.2. NIVELES DE GlcCer EN EL GRUPO CONTROL Y FRECUENCIAS GENOTÍPICAS PARA LAS MUTACIONES ESTUDIADAS EN EL INTRÓN 1 DEL GEN DE LA UGCG.

LOCALIZACIÓN	MUTACIÓN	CONTROLES N (frecuencia)		GlcCer (ug/ml)	P
INTRÓN 1	A 148 G	259		6,16 ± 1,53	
	AA	146	0,56	6,12 ± 1,55	0,873
	AG	96	0,37	6,26 ± 1,57	
	GG	17	0,07	5,92 ± 1,19	
	A 166T	260		6,16 ± 1,53	
	AA	120	0,46	6,12 ± 1,58	0,905
	AT	120	0,46	6,21 ± 1,52	
TT	20	0,08	6,13 ± 1,53		

Valores de GlcCer expresados como media ± DE (µg/ml).

N: tamaño muestral; GlcCer: glucosilceramida; P significación estadística.

TABLA 4.3.4.8. FRECUENCIAS DE LAS MUTACIONES ESTUDIADAS EN EL INTRÓN 1 DEL GEN DE LA UGCG EN PACIENTES Y CONTROLES.

LOCALIZACIÓN	MUTACIÓN	PACIENTES N (frecuencia)		CONTROLES N (frecuencia)		OR (IC 95%)	P
INTRÓN 1	A 148 G	211		259			
	AA	119	0,56	146	0,56	1,031 (0,704-1,511)	0,922
	AG	75	0,36	96	0,37		
	GG	17	0,08	17	0,07		
	A 166T	211		260			
	AA	101	0,48	120	0,46	1,027 (0,709-1,511)	0,925
	AT	96	0,45	120	0,46		
TT	14	0,07	20	0,08			

Tomamos como grupo de referencia (*) el genotipo en ausencia de la mutación.

N: tamaño muestral; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; P significación estadística.

TABLA 4.3.4.3. NIVELES DE GlcCer EN EL GRUPO CONTROL Y FRECUENCIAS GENOTÍPICAS PARA LAS MUTACIONES ESTUDIADAS EN EL INTRÓN 2 DEL GEN DE LA UGCG.

LOCALIZACIÓN	MUTACIÓN	CONTROLES N (frecuencia)		GlcCer (ug/ml)	P
INTRÓN 2	del. 5pb 17574	47		6,31 ± 1,89	
	- / -	24	0,51	6,15 ± 2,28	0,246
	- / +	20	0,43	6,71 ± 1,34	
	+ / +	3	0,06	5,00 ± 0,95	
	del 5 pb	23	0,49		
	C 25510 G	203		6,03 ± 1,49	
	CC	198	0,98	6,04 ± 1,49	0,380
CG	5	0,02	5,49 ± 1,09		
GG	0	0,00	-		

Valores de GlcCer expresados como media ± DE (µg/ml).

N: tamaño muestral; GlcCer: glucosilceramida; P significación estadística.

TABLA 4.3.4.9. FRECUENCIAS DE LAS MUTACIONES ESTUDIADAS EN EL INTRÓN 2 DEL GEN DE LA UGCG EN PACIENTES Y CONTROLES.

LOCALIZACIÓN	MUTACIÓN	PACIENTES N (frecuencia)		CONTROLES N (frecuencia)		OR (IC 95%)	P
INTRÓN 2	del. 5pb 17574	36	1	47			
	- / -	13	0,36	24	0,51	1*	
	- / +	20	0,56	20	0,43	1,672 (0,680-4,110)	0,365
	+ / +	3	0,08	3	0,06	1,442 (0,280-7,439)	0,686
	del 5 pb	23	0,64	23	0,49	1,846 (0,759-4,490)	0,190
	C 25510 G	185	1	203			
	CC	180	0,97	198	0,98	1*	
	CG	5	0,03	5	0,02	1,172 (0,334-4,115)	1,000
	GG	0	0,00	0	0,00		

Tomamos como grupo de referencia (*) el genotipo en ausencia de la mutación.

N: tamaño muestral; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; P significación estadística.

Sin embargo, al comprobar mediante secuenciación directa los resultados obtenidos mediante mini-secuenciación para este polimorfismo, en un grupo de 36 pacientes y 47 controles, y aunque no era una mutación inicialmente seleccionada, pudimos determinar en el cromatograma las frecuencias genotípicas para la delección de 5 pb localizada en posición 17574 en el intrón 2 del gen de la UGCG (rs3217582). En presencia de la delección se observó una asociación con niveles reducidos de GlcCer ($P=0,246$), y tendencia a aumentar el riesgo de VTE ($OR=1,846$; $IC95%=0,759-4,490$; $P=0,190$) (TABLAS 4.3.4.3 y 4.3.4.9), necesitando ampliar el número de casos estudiados para comprobar si estos resultados se mantienen.

De forma similar, tampoco encontramos ninguna asociación entre genotipo, niveles de GlcCer y riesgo de VTE para la mutación C25510G en el intrón 2 del gen de la UGCG (rs41279075) (TABLAS 4.3.4.3 y 4.3.4.9).

En cuanto al polimorfismo C27566T (rs1134931) identificado en el exón 4 del gen de la UGCG, en presencia del genotipo 27566CT se observó una tendencia a aumentar el riesgo de VTE (OR=2,761; IC95%= 0,254-31,06; $P=0,575$) (TABLAS 4.3.4.4 Y 4.3.4.10), pero dada su baja frecuencia en la población (heterocigosidad = 0,025) la consideramos una mutación puntual. Así, decidimos no analizar esta mutación en el resto de pacientes y controles.

TABLA 4.3.4.4. NIVELES DE GlcCer EN EL GRUPO CONTROL Y FRECUENCIAS GENOTÍPICAS PARA LAS MUTACIONES ESTUDIADAS EN EL INTRÓN 3 Y EXÓN 4 DEL GEN DE LA UGCG.

LOCALIZACIÓN	MUTACIÓN	CONTROLES N (frecuencia)		GlcCer (ug/ml)	P
INTRÓN 3	del. 4 pb 27435	94		6,39 ± 1,88	
	- / -	51	0,54	6,08 ± 1,87	0,056
	- / +	36	0,38	6,5 ± 1,70	
	+ / +	7	0,07	8,09 ± 2,13	
	del 4 pb	43	0,45		
EXÓN 4	C 27566 T	94		6,39 ± 1,88	
	CC	93	0,99	6,39 ± 1,89	0,568
	CT	1	0,01	6,92	
	TT	0	0,00	-	

Valores de GlcCer expresados como media ± DE (µg/ml).

N: tamaño muestral; GlcCer: glucosilceramida; P significación estadística.

TABLA 4.3.4.10. FRECUENCIAS DE LAS MUTACIONES ESTUDIADAS EN EL INTRÓN 3 Y EXÓN 4 DEL GEN DE LA UGCG EN PACIENTES Y CONTROLES.

LOCALIZACIÓN	MUTACIÓN	PACIENTES N (frecuencia)		CONTROLES N (frecuencia)		OR (IC 95%)	P
INTRÓN 3	del. 4 pb 27435	73	1	94			
	- / -	45	0,62	51	0,54	1*	
	- / +	23	0,32	36	0,38	0,618 (0,355-1,308)	0,256
	+ / +	5	0,07	7	0,07	0,722 (0,220-1,308)	0,769
	del 4 pb	28	0,39	43	0,45	0,738 (0,396-1,375)	0,349
EXÓN 4	C 27566 T	73	1	94			
	CC	71	0,97	93	0,99	1*	
	CT	2	0,03	1	0,01	2,761 (0,254-31,06)	0,575
	TT	0	0,00	0	0,00		

Tomamos como grupo de referencia (*) el genotipo en ausencia de la mutación.

N: tamaño muestral; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; P significación estadística.

La detección de este polimorfismo se realizó mediante secuenciación directa del fragmento amplificado, el cual contenía también la delección de 4pb en posición 27435 correspondiente al intrón 3 del gen de la UGCG (rs35471909). Así, y aunque no fue una mutación inicialmente seleccionada para la ampliación del estudio,

podimos observar que la delección se asociaba con niveles aumentados de GlcCer ($P=0,056$), y tendía a disminuir el riesgo de VTE ($OR=0,738$; $IC95\%= 0,396-1,375$; $P=0,349$) (TABLAS 4.3.4.4 Y 4.3.4.10), necesitando ampliar el número de casos estudiados, con el fin de comprobar si estos resultados se mantienen.

En cuanto a la mutación C29182A (rs17853855) identificada en el exón 5 del gen de la UGCG, en presencia del alelo 29182A se observó una tendencia a niveles aumentados de GlcCer ($P=0,489$) y reducción del riesgo de VTE ($OR=0,353$; $IC95\%= 0,016-7,677$; $P=0,539$), pero dada su baja frecuencia en la población (heterocigosidad=0,025), la consideramos una mutación puntual. Así, decidimos no analizar esta mutación en el resto de pacientes y controles. Las frecuencias genotípicas de las mutaciones C29322T y A29312G (rs72757814) localizadas en el intrón 5 no mostraron diferencias entre pacientes con VTE y controles, ni tampoco las mostraron los niveles de GlcCer (TABLAS 4.3.4.5 y 4.3.4.11).

TABLA 4.3.4.5. NIVELES DE GlcCer EN EL GRUPO CONTROL Y FRECUENCIAS GENOTÍPICAS PARA LAS MUTACIONES ESTUDIADAS EN EL EXÓN E INTRÓN 5 DEL GEN DE LA UGCG.

LOCALIZACIÓN	MUTACIÓN	CONTROLES N (frecuencia)		GlcCer (ug/ml)	P
EXÓN 5	G 29182 A	43		5,86 ± 1,74	
	GG	41	0,95	5,83 ± 1,77	0,489
	GA	2	0,05	6,59 ± 1,04	
	AA	0	0,00	-	
INTRÓN 5	A 29312 G	199		5,96 ± 1,40	
	AA	148	0,74	5,91 ± 1,43	0,490
	AG	48	0,24	6,09 ± 1,29	
	GG	3	0,02	6,58 ± 1,85	
	C 29322 T	200		5,96 ± 1,40	
	CC	200	1,00	5,96 ± 1,40	-
	CT	0	0,00	-	
TT	0	0,00	-		

Valores de GlcCer expresados como media ± DE (µg/ml).

N: tamaño muestral; GlcCer: glucosilceramida; P significación estadística.

TABLA 4.3.4.11. FRECUENCIAS DE LAS MUTACIONES ESTUDIADAS EN EL EXÓN 5 E INTRÓN 5 DEL GEN DE LA UGCG EN PACIENTES Y CONTROLES.

LOCALIZACIÓN	MUTACIÓN	PACIENTES N (frecuencia)		CONTROLES N (frecuencia)		OR (IC 95%)	P
EXÓN 5	G 29182 A	23	1	43			
	GG	23	1,00	41	0,95	1*	
	GA	0	0,00	2	0,05	0,353 (0,016-7,677)	0,539
	AA	0	0,00	0	0,00		
INTRÓN 5	A 29312 G	161	1	199			
	AA	122	0,76	148	0,74	1*	
	AG	37	0,23	48	0,24	0,998 (0,612-1,629)	1,000
	GG	2	0,01	3	0,02		
	C 29322 T	162	1	200			
	CC	162	1,00	200	1,00	1*	
	CT	0	0,00	0	0,00		
	TT	0	0,00	0	0,00		

Tomamos como grupo de referencia (*) el genotipo en ausencia de la mutación.

N: tamaño muestral; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; P: significación estadística.

El polimorfismo localizado en el exón 8 del gen de la UGCG se asoció con niveles plasmáticos de GlcCer aumentados. Así, los individuos portadores del alelo 34991G tenían niveles de GlcCer significativamente más elevados que los individuos que no portaban dicho alelo ($P=0,027$) (TABLA 4.3.4.6). Ello concuerda con la tendencia protectora del genotipo 34991GG frente al VTE (OR=0,668;

TABLA 4.3.4.6. NIVELES DE GlcCer EN EL GRUPO CONTROL Y FRECUENCIAS GENOTÍPICAS PARA LAS MUTACIONES ESTUDIADAS EN EL EXÓN 8 DEL GEN DE LA UGCG.

LOCALIZACIÓN	MUTACIÓN	CONTROLES N (frecuencia)		GlcCer (ug/ml)	P
EXÓN 8	A34991G	260		6,16 ± 1,53	
	AA	142	0,55	6,02 ± 1,56	0,027
	AG	99	0,38	6,20 ± 1,46	
	GG	19	0,07	7,00 ± 1,52	

Valores de GlcCer expresados como media ± DE (µg/ml).

N: tamaño muestral; GlcCer: glucosilceramida; P: significación estadística.

TABLA 4.3.4.12. FRECUENCIAS DE LAS MUTACIONES ESTUDIADAS EN EL EXÓN 8 DEL GEN DE LA UGCG EN PACIENTES Y CONTROLES.

LOCALIZACIÓN	MUTACIÓN	PACIENTES N (frecuencia)		CONTROLES N (frecuencia)		OR (IC 95%)	P
EXÓN 8	A34991G	214	1	260			
	AA	110	0,51	142	0,55	1*	
	AG	93	0,43	99	0,38	1,13 (0,780-1,637)	0,571
	GG	11	0,05	19	0,07		

Tomamos como grupo de referencia (*) el genotipo en ausencia de la mutación.

N: tamaño muestral; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; P: significación estadística.

IC95%= 0,311-1,436; $P=0,351$) (TABLA 4.3.4.12).

A continuación, seleccionamos aquellas mutaciones en las que obtuvimos resultados significativos o cerca de la significación, tanto para los niveles de GlcCer como el riesgo de VTE, con el fin de realizar un análisis multivariante para estimar el riesgo de VTE asociado a la frecuencia genotípica de pacientes y controles, incluyendo otros parámetros que influyen sobre la enfermedad, y por tanto, podrían enmascarar su efecto sobre el evento trombótico (TABLA 4.3.4.13). Solamente la presencia de la inserción de 10 pb en homocigosis en la región 5' UTR del gen de la UGCG aparece significativa tras ajustar el OR para los niveles plasmáticos de APC. Así, individuos portadores de la inserción en homocigosis tienen menos riesgo de sufrir un evento trombótico que aquellos no portadores (OR=0,343; IC 95%=0,123-0,955; $P=0,037$).

TABLA 4.3.4.13. RIESGO DE TEV PARA LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS EN EL GEN DE LA UGCG CON RESULTADOS SIGNIFICATIVOS EN PACIENTES Y CONTROLES.

PARÁMETRO	OR (IC 95%)	
	MODELO 1	MODELO 2
Ins 10 pb 5'UTR en homocigosis	0,474 (0,192-1,166)	0,343 (0,123-0,955)
Del 5 pb I2 rs3217582	1,849 (0,746-4,585)	1,871 (0,728-4,811)
Del 4 pb I3 rs35471909	0,735 (0,392-1,379)	0,794 (0,409-1,544)
34991GG E8 rs7850023	0,673 (0,312-1,450)	0,708 (0,314-1,597)

MODELO 1 = ORs ajustados por edad, sexo y presencia de defectos trombofílicos.
MODELO 2 = como en el modelo 1 pero además ajustado por los niveles plasmáticos de APC y GlcCer.

Con la finalidad de comprobar si este efecto sobre el riesgo de VTE está asociado al efecto del APC y/o GlcCer, se realizó un análisis multivariante (TABLA 4.3.4.14). Observamos que al ajustar el OR por niveles disminuidos de APC, el riesgo para la inserción de 10 pb en la región 5' UTR del gen de la UGCG disminuye (OR=0,390; IC 95%= 0,138-1,101).

TABLA 4.3.4.14. RIESGO DE TEV PARA LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE APC Y GlcCer EN PACIENTES Y CONTROLES.

PARÁMETRO	OR (IC 95%)			
	MODELO 1	MODELO 2	MODELO 3	MODELO 4
ins 10 pb en homocigosis	0,474 (0,192-1,166)	0,474 (0,192-1,172)	0,391 (0,139-1,103)	0,390 (0,138-1,101)
Percentil 10 GlcCer	2,133 (1,325-3,433)	1,776 (1,012-3,117)	1,904 (1,154-3,144)	1,766 (0,976-3,198)
Percentil 10 APC	4,544 (2,939-7,027)	4,189 (2,697-6,508)	6,705 (3,495-12,865)	6,566 (3,417-12,616)

MODELO 1 = ORs ajustados por edad, sexo y presencia de defectos trombofílicos.

MODELO 2 = como en el modelo 1 pero además ajustado por los niveles plasmáticos de GlcCer.

MODELO 3 = como en el modelo 1 pero además ajustado por los niveles plasmáticos de APC.

MODELO 4 = como en el modelo 1 pero además ajustado por los niveles plasmáticos de GlcCer y APC.

4.4. ASOCIACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS A1 Y A3 DEL GEN DEL EPCR CON EL RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO PRECOZ

Los haplotipos A1 y A3 del gen del EPCR, que pueden detectarse mediante el genotipado de los polimorfismos 4678G/C y 4600A/G respectivamente, son capaces de modificar el riesgo de VTE a través de su asociación con variaciones en los niveles plasmáticos de APC y sEPCR, como ya ha sido descrito previamente (Saposnik B *et al*, 2004; Medina P *et al*, 2004; Uitte de Willige S *et al*, 2004) y hemos visto en el apartado 4.1.3. Por otra parte, diversos estudios han sugerido la asociación entre mutaciones en el gen de la trombomodulina y EPCR y la trombosis arterial (Norlund L *et al*, 1997a; Ireland H *et al*, 1997; Le Flem L *et al*, 1998; Salomaa V *et al*, 1999a; Li YH *et al*, 2001 & 2002 & 2003 & 2006; Kunz G *et al*, 2002; Wu KK *et al*, 2001; Knowles JW *et al*, 2007; Konstantoulas CJ *et al*, 2004; Ireland H *et al*, 2005), aunque los resultados son contradictorios.

Además, nuestro grupo estudió previamente la asociación entre los niveles de APC, el riesgo de infarto de miocardio y el grado de afectación coronaria en pacientes jóvenes supervivientes de infarto de miocardio en los que la presencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos son menos frecuentes y, por tanto, deben actuar otros sistemas o factores adicionales en el origen del infarto de miocardio (España F *et al*, 2002b; Zorio E *et al*, 2006b). Así, se observó una menor concentración de APC circulante en pacientes con infarto de miocardio a edad temprana comparado con controles sanos, de forma que la deficiencia hereditaria de proteína C o niveles disminuidos de APC circulante pueden contribuir a un aumento del riesgo de infarto de miocardio precoz. Además, el número de arterias coronarias afectadas, así como la severidad de las lesiones coronarias, se correlacionaban inversamente con los niveles de APC, de forma que a menores niveles de APC el número y severidad de las lesiones era mayor (Zorio E *et al*, 2006b). Por lo tanto, es posible que las alteraciones del sistema hemostático jueguen un papel más importante en el desarrollo de la trombosis arterial a edad temprana.

Por todo ello, quisimos comprobar si estos dos haplotipos en el gen del EPCR son capaces también de modificar el riesgo de infarto de miocardio, sobre todo en individuos jóvenes en los que las arterias coronarias presentan una menor afectación y los factores de riesgo cardiovascular clásicos son menos frecuentes, y en los que, por tanto, el componente trombofílico puede jugar un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad. Para ello, genotipamos estos dos

polimorfismos en un grupo de pacientes con infarto de miocardio precoz y en un grupo control formado por sujetos sanos de similares características al de los pacientes, con el fin de determinar la asociación de estos dos haplotipos con el riesgo prematuro de infarto de miocardio. También cuantificamos en ambos grupos los niveles plasmáticos de APC y sEPCR, con los que se correlacionan ambos haplotipos, respectivamente.

4.4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON INFARTO DE MIOCARDIO Y CONTROLES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Como se indicó en Material y Métodos, el estudio incluía 689 individuos (601 hombres y 88 mujeres) que habían tenido un infarto de miocardio antes de los 51 años de edad, procedentes de 3 hospitales españoles. El grupo control lo formaron 697 voluntarios sanos (608 hombres y 88 mujeres) de las mismas áreas geográficas y con similar distribución de edad y sexo al de los pacientes. La tabla 4.4.1 muestra las principales características clínicas de los sujetos de estudio. No se encontraron diferencias significativas en la distribución de edad y sexo entre pacientes y controles.

TABLA 4.4.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES Y CONTROLES.

CARACTERÍSTICAS	PACIENTES IM (N=689)	CONTROLES (N=697)	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (P)
Edad en el estudio (años)*	44 (35-50)	44 (34-51)	0,582
Edad al IM (años)*	42 (34-49)	-	-
Hombres, n (%)	601 (87,2)	608 (87,2)	0,962
Tabaquismo, n (%)	604 (87,7)	329 (47,3)	<0,001
Dislipemia, n (%)	432 (62,7)	182 (26,1)	<0,001
Hipertensión, n (%)	240 (34,8)	88 (12,6)	<0,001
Diabetes mellitus, n (%)	101 (14,7)	46 (6,6)	<0,001
BMI [†] ≥ 30 Kg/m ² , n (%)	172 (25,0)	83 (11,9)	<0,001
Síndrome metabólico, n (%)	180 (26,1)	70 (10,0)	<0,001

* Valores expresados como mediana (percentiles 10-90)

† BMI: índice de masa corporal

Además, y como era de esperar, la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular analizados era significativamente más frecuente en el grupo de pacientes que en el de controles y similar a la descrita en otros estudios y registros realizados en nuestra área geográfica (Tormo Díaz MJ *et al*, 1997) . Ello sugiere que nuestro grupo control era un grupo representativo de la población general.

4.4.2. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS 4600A/G Y 4678G/C DEL GEN DEL EPCR Y RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO PRECOZ

El genotipado de los polimorfismos 4600A/G (haplotipo A1) y 4678G/C (haplotipo A3) del gen del EPCR se realizó como se describe en el apartado 4.1.2. La tabla 4.4.2.1 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas observadas para dichos polimorfismos. Ambos haplotipos eran significativamente más frecuentes en el grupo de controles que en el de pacientes con infarto de miocardio.

TABLA 4.4.2.1. DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS 4600A/G Y 4678G/C EN EL GEN DEL EPCR, E INFLUENCIA SOBRE EL RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO.

POLIMORFISMO	PACIENTES (N=689)		CONTROLES (N=697)		OR (IC 95%) SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (P)
	N	Frecuencia (%)	N	Frecuencia (%)	
4600A/G					
Genotipo AA	606	88,0	554	79,5	1*
Genotipo AG	80	11,6	142	20,4	0,53 (0,39-0,71) ^{&} P<0,001
Genotipo GG	3	0,4	1	0,1	
Alelo A	1292	93,8	1250	89,7	1*
Alelo G	86	6,2	144	10,3	0,53 (0,40-0,71) P<0,001
4678G/C					
Genotipo GG	235	34,1	201	30,1	1*
Genotipo GC	316	45,9	339	48,0	0,80 (0,62-1,02) P = 0,073
Genotipo CC	138	20,0	157	21,9	0,75 (0,56-1,01) P = 0,060
Alelo G	786	57,0	741	53,2	1*
Alelo C	592	43,0	653	46,8	0,85 (0,74-0,99) P = 0,044

* Grupo de referencia.

& AA vs AG+GG

Puesto que el grupo control fue reclutado en tres áreas geográficas españolas diferentes, analizamos las frecuencias para cada haplotipo en las tres poblaciones por separado. Las frecuencias del haplotipo A3 eran 0,107, 0,105 y 0,097 según las muestras procedieran de Valencia, Murcia o Barcelona, respectivamente, mientras que las frecuencias del haplotipo A1 eran 0,472, 0,452 y 0,493, respectivamente, sin que se observaran diferencias significativas entre ellas.

La frecuencia esperada para el genotipo 4600GG en el grupo control era de alrededor del 1% (6 ó 7 portadores de los 697 controles totales), mientras que, inicialmente y genotipando las muestras usando el análisis por SSCP, no encontramos ningún individuo control portador de dicho genotipo. Con el fin de excluir errores en el genotipado de nuestras muestras, analizamos mediante secuenciación directa todos los pacientes y controles no portadores del haplotipo A1, es decir todos aquellos con el genotipo 4678GG, puesto que son los únicos individuos que potencialmente podrían ser portadores del genotipo 4600GG o haplotipo A3. También secuenciamos todos los pacientes y controles portadores del genotipo 4600AG. Solamente un individuo control que había sido genotipado inicialmente como portador del genotipo 4600AG mediante SSCPS, fue portador del genotipo 4600GG al estudiarlo por secuenciación directa. Por lo tanto, la frecuencia de este genotipo para el grupo control era de 0,001, similar a la observada en estudios previos para individuos sanos por nuestro grupo (Medina P *et al*, 2004 & 2005).

Con fin de analizar con más detalle la asociación entre los polimorfismos en el gen del EPCR y el riesgo de infarto de miocardio precoz, realizamos un análisis de regresión logística (TABLA 4.4.2.2). En el análisis univariante, la presencia del haplotipo A3 y, en menor medida, el haplotipo A1, redujo el riesgo de infarto de miocardio precoz (OR=0,53; IC 95%= 0,40-0,71 y OR=0,85; IC 95%=0,74-0,99 respectivamente). Tras el ajuste para edad, sexo y los factores de riesgo cardiovascular clásicos, tanto la presencia del alelo A3 como la del alelo A1 permanecieron asociadas con una reducción del riesgo de infarto de miocardio precoz (OR=0,51; IC 95%= 0,32-0,63 y OR=0,72; IC 95%=0,44-0,84 respectivamente). En contraste, los factores de riesgo cardiovascular tales como tabaquismo, dislipemia, hipertensión, diabetes mellitus y obesidad, tenían ORs mayores de 2,0.

TABLA 4.4.2.2. ASOCIACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS A1 y A3 EN EL GEN DEL EPCR Y OTROS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULARES CON EL RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO PRECOZ.

PARÁMETROS	PACIENTES		CONTROLES		OR (IC 95%)	
	N	Frecuencia	N	Frecuencia	MODELO 1	MODELO 2
Presencia del alelo 4600G (A3)	83	0,12	144	0,21	0,53 (0,40-0,71)	0,51 (0,32-0,63)
Presencia del alelo 4678G (A1)	454	0,66	496	0,72	0,85 (0,74-0,99)	0,72 (0,44-0,84)
FUMADORES	604	0,88	329	0,47	7,81 (5,96-10,34)	5,43 (3,87-7,60)
DISLIPEMIA	432	0,63	182	0,26	4,80 (3,84-6,16)	2,93 (2,10-4,03)
HIPERTENSIÓN	240	0,35	88	0,13	3,62 (2,73-4,77)	2,50 (1,86-3,74)
DIABETES MELLITUS	101	0,15	46	0,07	2,43 (1,74-3,59)	2,33 (1,40-3,77)
BMI \geq 30kg/m ²	172	0,25	83	0,12	2,56 (1,80-3,58)	2,53 (1,74-3,88)

MODELO 1 = datos crudos.

MODELO 2 = ORs ajustados para edad, sexo, y presencia de los otros 6 parámetros citados en la tabla.

Ireland y colaboradores (2005) observaron que la aparente protección frente a la enfermedad coronaria presente en los portadores del haplotipo A3 desaparecía en presencia de diabetes o síndrome metabólico. Nosotros analizamos por separado un subgrupo de 101 pacientes con infarto de miocardio y 46 controles afectados de diabetes mellitus. Tras el ajuste para otros factores de riesgo cardiovascular, la presencia del haplotipo A3 aumentó la protección frente al infarto de miocardio precoz (OR=0,40; IC 95% = 0,15-0,80), mientras que el haplotipo A1 perdió su papel protector (OR=0,89; IC 95% = 0,42-1,89). También analizamos un subgrupo de 180 pacientes y 70 controles que presentaban síndrome metabólico. Tras el ajuste por otros factores de riesgo cardiovascular, tanto la presencia del haplotipo A1 como la del haplotipo A3 se asociaban con una reducción del riesgo de infarto de miocardio precoz (OR=0,44; IC 95%=0,24-0,75 y OR=0,87; IC 95%=0,56-0,98, respectivamente).

TABLA 4.4.2.3. EFECTO DE LA PRESENCIA SIMULTÁNEA, DE UNO O NINGUNO DE LOS HAPLOTIPOS A1 Y A3 DEL GEN DEL EPCR SOBRE EL RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO PRECOZ.

COMBINACIÓN DE GENOTIPOS	PACIENTES		CONTROLES		OR (IC 95%) SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (P)
	N	Frecuencia	N	Frecuencia	
4600AA+4678GG (no A1 no A3)	179	0,26	133	0,19	1*
4600AG+4678GG (solo A3 presente)	53	0,08	68	0,10	0,55 (0,76-0,86) P = 0,010
4600AA+4678GC o CC (solo A1 presente)	427	0,62	421	0,60	0,73 (0,56-0,92) P = 0,010
4600AG+4678GC (A1 y A3 presentes)	27	0,04	75	0,11	0,26 (0,18-0,39) P = 0,010
4600AG+4678GG (solo A3 presente)	53	0,08	68	0,10	1*
4600AG+4678GC (A1 y A3 presentes)	27	0,04	75	0,11	0,44 (0,23-0,78) P = 0,006
4600AA+4678GC o CC (solo A1 presente)	427	0,62	421	0,60	1*
4600AG+4678GC (A1 y A3 presentes)	27	0,04	75	0,11	0,34 (0,21-0,55) P < 0,001

* Grupo de referencia

A1 y A3 hacen referencia a los haplotipos A1 y A3 del gen del EPCR.

Puesto que tanto la presencia del haplotipo A1 como la del A3 parecían reducir el riesgo de infarto de miocardio precoz, estudiamos el efecto sobre el riesgo de infarto de miocardio de la presencia simultánea de ambos haplotipos comparado con la presencia de solamente uno o ninguno de estos haplotipos. Como se puede observar en la tabla 4.4.2.3, y en ambos casos, los efectos protectores de los haplotipos A1 y A3 parecen ser aditivos.

4.4.3. NIVELES DE PROTEÍNA C ACTIVADA (APC) Y sEPCR Y RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO PRECOZ

Puesto que los haplotipos A1 y A3 en el gen del EPCR están asociados con niveles plasmáticos aumentados de APC y sEPCR respectivamente, determinamos ambos parámetros en un subgrupo de 260 pacientes con infarto de miocardio precoz y 260 individuos sanos de los que disponíamos plasma para dicha determinación y no estaban sometidos a tratamiento con anticoagulantes orales. La

distribución de haplotipos y genotipos en este subgrupo era similar a la observada en el grupo total. La tabla 4.4.3.1 muestra los niveles plasmáticos de APC en pacientes y controles de acuerdo con el polimorfismo 4678G/C del gen del EPCR. Los niveles de APC, como ya había sido descrito previamente para pacientes con VTE (España F *et al*, 2001; Medina P *et al*, 2004), aumentaron conforme aumentaba el número de alelos 4678C (haplotipo A1) presentes, tanto en controles como en pacientes, aunque en este último caso sin alcanzar significación estadística.

TABLA 4.4.3.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS NIVELES DE APC SEGÚN LOS GENOTIPOS PARA EL POLIMORFISMO 4678G/C EN EL GEN DEL EPCR EN PACIENTES Y CONTROLES.

GENOTIPO	PACIENTES (N=260)			CONTROLES (N=260)		
	N	APC(ng/ml) mediana	(percentiles 10-90)	N	APC(ng/ml) mediana	(percentiles 10-90)
TODOS	260	1,06	0,65-1,57	260	1,22	0,80-1,84
4678GG	89	1,02	0,65-1,60	78	1,06	0,73-1,56
4678GC	120	1,07	0,66-1,41	123	1,21	0,84-1,88
4678CC	51	1,15	0,64-1,86	57	1,39	0,86-1,98
GG vs CC ¶	0,069			0,057		
K-W test *	0,133			0,001		

¶ ANOVA

* Prueba de Kruskal-Wallis

Al estratificar los niveles de APC por cuartiles, según los niveles de APC en el grupo control, y comparando con el cuarto cuartil, el riesgo de infarto de miocardio aumentaba conforme disminuía el cuartil. Además, el análisis de regresión logística mostró que, cuando analizamos el nivel de APC como variable continua, el riesgo de infarto de miocardio aumentó un 50% por cada descenso de un desvío estándar (0,40 ng/ml) en los niveles de APC (OR=1,5; IC 95%=1,3-2,1) (TABLA 4.4.3.2). Esta asociación se mantuvo significativa al ajustar por el haplotipo A1 (OR=1,4; IC95%=1,2-2,3). Sin embargo, al introducir en el modelo tanto la presencia del haplotipo A1 como el cuarto cuartil para los niveles plasmáticos de APC en el grupo control, este efecto protector desaparece (OR=1,0; IC 95%=0,7-1,5).

Los niveles plasmáticos de sEPCR se vieron modificados en presencia del alelo 4600G (haplotipo A3), como era de esperar y de acuerdo a los resultados

obtenidos previamente (Saposnik B *et al*, 2004; Medina P *et al*, 2004; Uitte de Willige S *et al*, 2004). El nivel de sEPCR fue significativamente mayor en los portadores del haplotipo A3 que en aquellos sin este haplotipo, tanto en el grupo control como en el de pacientes con infarto de miocardio.

TABLA 4.4.3.2. NIVELES DE EPCR SOLUBLE SEGÚN LOS GENOTIPOS PARA EL POLIMORFISMO 4600A/G EN EL GEN DEL EPCR EN PACIENTES Y CONTROLES.

GENOTIPO	PACIENTES (N=260)			CONTROLES (N=260)		
	N	sEPCR(ng/ml) mediana	(percentiles 10-90)	N	sEPCR(ng/ml) mediana	(percentiles 10-90)
TODOS	260	106	66-1304	260	113	75-2814
4600AA	229	96	66-144	206	103	70-145
4600AG	30	383	231-491	53	281	189-396
4600GG	1	602	502-790	1	495	
AA vs GG ¶		<0,001			<0,001	

¶ ANOVA

Al estratificar los niveles de sEPCR por cuartiles, según los niveles de sEPCR en el grupo control, y comparando con el primer cuartil, el riesgo de infarto de miocardio para individuos con niveles de sEPCR en el cuarto cuartil era de 0,57 (IC95%=0,34-0,95). Al introducir en el modelo de regresión la presencia del haplotipo A3, el efecto protector frente al riesgo de infarto de miocardio se mantuvo (OR=0,61; IC95%=0,43-0,94). Sin embargo, al introducir en el modelo de regresión tanto la presencia del haplotipo A3 como el cuarto cuartil de sEPCR, este efecto desapareció (OR=0,70; IC95%=0,33-1,43 y OR=0,83; IC95%=0,29-1,65 respectivamente).

Puesto que un nivel elevado de sEPCR puede inhibir la activación de la proteína C (Ghosh S *et al*, 2007; López-Sagaseta J *et al*, 2007; Molina E *et al*, 2008), calculamos la correlación entre los niveles de APC y de sEPCR en pacientes y controles, tanto en el grupo completo como en cada subgrupo de acuerdo con el genotipo para el polimorfismo 4600A/G. Ninguna de las correlaciones calculadas fue significativa, excepto aquella para el subgrupo de individuos controles portadores del genotipo 4600AG ($r = -0,248$, $P = 0,041$).

4.5. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C EN LA ENFERMEDAD DE BEHÇET Y SU CORRELACIÓN CON EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO

La enfermedad de Behçet consiste en un desorden inflamatorio multisistémico de origen desconocido, asociado con daño endotelial causado por vasculitis. Los pacientes con la enfermedad de Behçet presentan un estado procoagulante, encontrando que un 25% de estos pacientes sufren trombosis, aunque el mecanismo que explica la formación del trombo en estos pacientes es desconocido.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo (Navarro S *et al*, 2004), se evaluó el sistema de activación de la proteína C en la enfermedad de Behçet, con la finalidad de analizar su correlación con el riesgo de trombosis. Se observó que los pacientes con la enfermedad de Behçet tienen niveles reducidos de APC circulante, causando un estado de hipercoagulabilidad que podría explicar la elevada incidencia de VTE observada en dichos pacientes. Así, y puesto que los haplotipos A1 y A3 del gen del EPCR son capaces de modificar el riesgo de VTE a través de su asociación con variaciones en los niveles plasmáticos de APC y sEPCR (Saposnik B *et al*, 2004; Medina P *et al*, 2004; Uitte de Willige S *et al*, 2004), como ya ha sido descrito previamente y hemos visto en los apartados 4.1.3 y 4.4.3, quisimos analizar la frecuencia de estas mutaciones en los grupos de pacientes con Behçet y controles, mediante el genotipado de los polimorfismos 4678G/C y 4600A/G del gen del EPCR respectivamente, con el fin de determinar si influyen en la mayor predisposición al desarrollo de trombosis asociada con esta enfermedad, y si explican los niveles reducidos de APC observados en estos pacientes, de forma similar al estudio realizado en el apartado 4.1 para individuos portadores de la mutación 20210A.

4.5.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES Y CONTROLES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Estudiamos un grupo de 39 pacientes diagnosticados de Behçet, de entre los cuales doce presentaron VTE. Sólo dos de los pacientes se encontraban en fase activa de la enfermedad, caracterizada por afectación ocular grave, el resto se encontraban en fase inactiva o mínima de la enfermedad. La duración media de la enfermedad fue de $8,5 \pm 5,9$ años, y rango de 1 a 15 años.

El grupo control estaba formado por 78 individuos sanos con similar distribución de edad y sexo al del grupo de pacientes.

La tabla 4.7.1 muestra las principales características clínicas de los pacientes diagnosticados de enfermedad de Behçet e individuos control incluidos en el estudio. No hubo diferencias significativas entre pacientes y controles para ninguna de las características clínicas analizadas, ni tampoco respecto a la distribución de edad y sexo ni en cuanto al porcentaje de fumadores.

TABLA 4.5.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES Y CONTROLES.

PARÁMETROS	PACIENTES N = 39	CONTROLES N = 78	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (P)
EDAD (años; media ± DE)	42,4 ± 12,1	41,8 ± 11,3	0,896
HOMBRES (%)	48,7	48,7	1,000
FUMADORES (%)	28,2	38,4	0,296
ÚLCERAS BUCALES (%)	100	-	-
ÚLCERAS GENITALES (%)	77	-	-
ARTRALGIA (%)	67	-	-
FIEBRE (%)	51	-	-
AFECTACIÓN OCULAR (%)	49*	-	-
AFECTACIÓN CUTÁNEA (%)	44 ^{&}	-	-
EVENTOS TROMBÓTICOS (%)	31	-	-
EVENTOS NEUROLÓGICOS (%)	28	-	-
AFECTACIÓN GASTROINTESTINAL (%)	13 ^{\$}	-	-

*Diez pacientes con uveítis posterior, cuatro anterior y cinco con otras.

[&]Doce pacientes con pseudofoliculitis, siete con eritema nodosum, dos con vasculitis y cuatro con otros.

^{\$}Doce pacientes con afectación del sistema nervioso central y uno con afectación del sistema nervioso periférico.

4.5.2. PARÁMETROS DE LA COAGULACIÓN EN PACIENTES Y CONTROLES

Ninguno de los pacientes con enfermedad de Behçet presentaba deficiencia de proteína C, proteína S, AT, plasminógeno o cofactor II de la heparina, mientras

que uno de los controles era deficiente en proteína C. Encontramos un paciente heterocigoto para la mutación factor V Leiden, otro para la mutación 20210A en el gen de la protrombina, y un tercero heterocigoto para ambas mutaciones. En el grupo control había 2 individuos heterocigotos para la mutación factor V Leiden y 3 individuos para la protrombina 20210A ($P=0,095$ y $P<0,5$ respectivamente).

En todos ellos, y anteriormente, se realizó un estudio de trombofilia, que incluía los siguientes parámetros: AT, proteína C, proteína S, plasminógeno, cofactor II de la heparina, inhibidor de la proteína C, α 1-AT, fibrinógeno, factor VIII, factor von Willebrand y proteína C reactiva. Todos los parámetros estudiados mostraron mayores niveles en los pacientes con la enfermedad de Behçet que en el grupo control, pero no mostraron diferencias entre los pacientes con Behçet que habían sufrido un VTE frente a los que no lo habían sufrido. El aumento de los niveles de los diferentes parámetros de la coagulación determinados en los pacientes con enfermedad de Behçet es producto del proceso de inflamación y el daño endotelial asociados a la enfermedad.

4.5.3. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS 4600A/G Y 4678G/C DEL GEN DEL EPCR Y RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO

El genotipado de los polimorfismos 4600A/G (haplotipo A1) y 4678G/C (haplotipo A3) del gen del EPCR se realizó como se ha descrito anteriormente en el apartado 4.1.2. La tabla 4.5.3.1 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas observadas para dichos polimorfismos en el grupo de pacientes con la enfermedad de Behçet y el grupo control. La frecuencia del alelo 4600G (haplotipo A3) era mayor en el grupo de controles que en el de pacientes con la enfermedad de Behçet (0,07 vs 0,04 respectivamente) ($P=0,321$). Sin embargo, no encontramos diferencias en las frecuencias del alelo 4678C (haplotipo A1) (0,05 vs 0,05 respectivamente) ($P=0,525$).

El análisis de regresión logística reveló (TABLA 4.5.3.1) que la presencia del alelo 4600G (haplotipo A3) tiende a disminuir el riesgo de padecer la enfermedad de Behçet (OR=0,508; IC 95%=0,133-1,937), pero sin llegar a una significación estadística. No se observaron diferencias en presencia del alelo 4678C (haplotipo A1) (OR=1,371; IC 95%=0,518-3,628). Al incluir en el modelo sexo y edad, los ORs no se vieron modificados (datos no mostrados en la tabla)

TABLA 4.5.3.1. DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS 4600A/G Y 4678G/C EN EL GEN DEL EPCR, E INFLUENCIA SOBRE EL RIESGO DE PADECER LA ENFERMEDAD, EN PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE BEHÇET Y CONTROLES.

POLIMORFISMO	PACIENTES (N=39)		CONTROLES (N=78)		OR (IC 95%) SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (P)
	N	Frecuencia	N	Frecuencia	
4600A/G					
Genotipo AA	36	0,92	67	0,86	1*
Genotipo AG	3	0,08	11	0,14	0,508 (0,133-1,938)
Genotipo GG	0	-	0	-	P = 0,380
Alelo A	75	0,96	145	0,93	1*
Alelo G	3	0,04	11	0,07	0,508 (0,133-1,937) P = 0,321
4678G/C					
Genotipo GG	7	0,18	18	0,23	1*
Genotipo GC	24	0,62	41	0,53	1,505 (0,549-4,125) P = 0,4687
Genotipo CC	8	0,20	19	0,24	1,083 (0,325-3,603) P = 1,000
Alelo G	38	0,49	77	0,49	1*
Alelo C	40	0,51	79	0,51	1,371 (0,518-3,628) P = 0,525

* Grupo de referencia.

En el estudio previo realizado por nuestro grupo (Navarro S *et al*, 2004), se demostró que niveles reducidos de APC circulante eran un riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Behçet. Por otra parte, los resultados obtenidos en la presente tesis sugieren que la presencia del alelo 4600G tiende a proteger frente a la enfermedad de Behçet. Por tanto, analizamos si ambos parámetros son factores de riesgo independientes. Así, realizamos un análisis de regresión logística incluyendo ambos parámetros (TABLA 4.5.3.2). Observamos que el ligero efecto protector asociado a la presencia del alelo 4600G (haplotipo A1) disminuye al ajustar por niveles disminuidos de APC (OR=0,756; IC 95%=0,183-3,133).

TABLA 4.5.3.2. RIESGO DE PADECER LA ENFERMEDAD DE BEHÇET, SEGÚN LA PRESENCIA DEL HAPLOTIPO A3 DEL GEN DEL EPCR O NIVELES REDUCIDOS DE APC CIRCULANTE, EN PACIENTES Y CONTROLES.

PARÁMETRO	OR (IC 95%)	
	MODELO 1	MODELO 2
Presencia del alelo 4600G (A3)	0,507 (0,133-1,938)	0,756 (0,183-3,133)
Niveles de APC < percentil 10	12,045 (4,176-34,743)	11,751 (4,046-34,128)

MODELO 1 = ORs ajustados por edad y sexo.

MODELO 2 = como en el modelo 1, pero además ajustado por cada uno de los parámetros estudiados.

La tabla 4.5.3.3 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas observadas para dichos polimorfismos en los pacientes con la enfermedad de Behçet, distribuidos según hubieran sufrido o no un evento trombótico. Observamos como tanto la frecuencia del alelo 4600G (haplotipo A3) como la del alelo 4678G (haplotipo A1) es mayor en aquellos pacientes con historia de VTE que en aquellos sin historia (0,00 vs 0,06 y 0,54 vs 0,46 respectivamente) ($P=0,549$ y $P=0,449$ respectivamente).

TABLA 4.5.3.3. DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS 4600A/G Y 4678G/C EN EL GEN DEL EPCR, E INFLUENCIA SOBRE EL RIESGO DE VTE EN PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE BEHÇET CON Y SIN HISTORIA DE VTE.

POLIMORFISMO	PACIENTES con VTE (N=12)		PACIENTES sin VTE (N=27)		OR (IC 95%) SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA (P)
	N	Frecuencia	N	Frecuencia	
4600A/G					
Genotipo AA	12	1	24	0,89	1*
Genotipo AG	0	-	3	0,11	0,280 (0,013-5,861)
Genotipo GG	0	-	0	-	$P = 0,539$
Alelo A	24	1	51	0,94	1*
Alelo G	0	-	3	0,06	0,300 (0,015-6,048)
					$P = 0,549$
4678G/C					
Genotipo GG	3	0,25	4	0,15	1*
Genotipo GC	7	0,58	17	0,63	0,549 (0,097-3,119)
Genotipo CC	2	0,17	6	0,22	$P = 0,6518$
Alelo G	13	0,54	25	0,46	0,444 (0,050-3,979)
Alelo C	11	0,46	29	0,54	$P = 0,608$
					1*
					0,522 (0,097-2,810)
					$P = 0,449$

* Grupo de referencia.

El análisis de regresión logística mostró que en los pacientes con la enfermedad de Behçet, la presencia tanto del alelo 4600G (haplotipo A3) como la del alelo 4678C (haplotipo A1) tiende a disminuir el riesgo de VTE (OR=0,300; IC95%=0,015-6,048 y OR=0,522; IC95%=0,097-2,810 respectivamente), aunque sin significación estadística.

5. – DISCUSIÓN

*“El cerebro no es un vaso para llenar,
sino una lámpara para encender”.
(Plutarco)*

5.1. ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS EN EL GEN DEL EPCR AL RIESGO DE VTE EN SUJETOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN 20210A EN EL GEN DE LA PROTROMBINA

La mutación 20210A de la PT, junto con la mutación FV Leiden, son los factores de riesgo de origen genético que con más frecuencia se asocian al VTE. Múltiples son los estudios realizados para estas dos mutaciones. La mutación 20210A se ha asociado con un aumento en el riesgo de recurrencia de VTE (Marchiori A *et al*, 2007), y diferentes estudios han demostrado que en presencia de otros factores de riesgo, el riesgo de VTE asociado a la mutación 20210A aumenta (Tirado I *et al*, 2001; Emmerich J *et al*, 2001; Martinelli I *et al*, 1999; Van Rooden CJ *et al*, 2004; Gisslinger H *et al*, 2005). Por lo tanto, la presencia de polimorfismos en proteínas implicadas en vías anticoagulantes, podría modificar el riesgo trombótico de individuos portadores de la mutación 20210A. Un posible candidato podría ser la vía anticoagulante de la PC. Puesto que el EPCR es uno de los componentes necesarios para la activación del sistema anticoagulante de la PC, nos planteamos investigar la asociación entre los haplotipos A1 y A3 del gen del EPCR y el riesgo trombótico asociado a individuos portadores de la mutación 20210A en el gen de la PT.

Tras el genotipado de los dos polimorfismos marcadores de los haplotipos A1 y A3 en el gen del EPCR, se observó que la frecuencia del alelo 4600G (haplotipo A3) era más frecuente en el grupo de pacientes con historia de VTE, no relacionados entre sí y portadores de la mutación 20210A (16,7%), que la previamente observada en sujetos sintomáticos (10,0%) y asintomáticos (10,2%) portadores de la mutación FV Leiden, en pacientes con VTE (9,4%), o en sujetos sanos (9,2%) (Medina P *et al*, 2004 & 2005). El estudio de las familias de estos pacientes con VTE portadores de la mutación 20210A mostró que el alelo 4600G (haplotipo A3) del EPCR estaba asociado con un aumento del riesgo de VTE en portadores del alelo 20210A. Además, los portadores del alelo 4600G experimentaron el primer episodio trombótico a una edad más joven, y estaban libres de trombosis a los 40 años en una menor proporción que los portadores del alelo 4600A. En contraste, el alelo 4678C (haplotipo A1) no modificó el riesgo de VTE en portadores del alelo 20210A, aunque la OR tendió a descender a medida que aumentaba el número de alelos 4678C, sugiriendo un efecto protector similar al observado en portadores del FV Leiden (Medina P *et al*, 2005). La falta de

significación estadística puede deberse al bajo número de individuos portadores del genotipo 4678CC.

El mecanismo por el cual la presencia del alelo 4600G (haplotipo A3) disminuye el riesgo trombotico en individuos portadores de la mutación 20210A en el gen de la PT no está claro. El haplotipo A3 se ha asociado con niveles elevados de sEPCR en plasma (Saposnik B *et al*, 2004; Medina P *et al*, 2004; Uitte de Willige S *et al*, 2004), pero no existe consenso en cuanto a si la presencia del haplotipo A3 *per se* aumenta el riesgo de VTE. Tres estudios indicaron que el haplotipo A3 no estaba asociado con un aumento del riesgo de VTE (Medina P *et al*, 2004; Uitte de Willige S *et al*, 2004), ni tenía efecto sobre el riesgo de VTE en portadores del factor V Leiden (Medina P *et al*, 2005). Sin embargo, otro estudio mostró que en hombres, pero no en mujeres, el haplotipo A3 estaba asociado con un aumento de 2,5 veces en el riesgo de VTE (Saposnik B *et al*, 2004). Dado que el sEPCR es capaz de unirse tanto a la PC como a la APC, se ha sugerido que niveles elevados de sEPCR pueden dar lugar a una reducida generación de APC y/o una inhibición de la función anticoagulante de la APC (Saposnik B *et al*, 2004), resultando en un descenso de los niveles circulantes de APC, con el consiguiente aumento del riesgo de VTE (España F *et al*, 2001). Nuestros resultados apoyarían esta hipótesis, puesto que la presencia del alelo 4600G está asociada con niveles elevados de sEPCR y niveles disminuidos de APC. Además, los elevados niveles de sEPCR están asociados con el VTE en portadores del alelo 20210A, independientemente del polimorfismo 4600A/G. Por otra parte, el efecto del alelo 4600G sobre el riesgo de VTE se observa de una forma más marcada en los portadores de la mutación 20210A en el gen de la PT, lo que podría indicar un modesto efecto protrombotico del haplotipo A3, vía niveles aumentados de sEPCR, y que sería evidente solamente en presencia de otro factor de riesgo. La pregunta entonces es porqué el efecto protrombotico del haplotipo A3 es observado en portadores del alelo 20210A (en nuestro estudio) y no en portadores del FV Leiden (Medina P *et al*, 2005). Para contestar a esta pregunta se necesita más información sobre el mecanismo protrombotico que ejercen estos factores de riesgo. Sin embargo, puesto que tanto el sEPCR como la PT son inhibidores de la APC (Smirnov MD *et al*, 1999), es posible que el haplotipo A3 del gen del EPCR tenga un efecto sinérgico con el de la mutación de la PT. Alternativamente, es posible que las familias estudiadas posean más factores de riesgo protrombotico, siendo la mutación en el gen de la PT únicamente un factor de bajo riesgo, y que ello favorezca la detección del polimorfismo del gen del EPCR como un factor que contribuya al riesgo trombotico.

El efecto protector del haplotipo A1 en portadores de la mutación 20210A del gen de la PT observado en este estudio fue menos efectivo que el observado en los individuos portadores del FV Leiden (Medina P *et al*, 2005). La presencia de este haplotipo está asociada con niveles circulantes de APC moderadamente más elevados, lo cual podría contrarrestar la resistencia a la APC asociada con la presencia del FV Leiden.

El mecanismo por el cual la mutación 20210A en el gen de la PT aumenta el riesgo de VTE vía elevados niveles de PT (Poort SR *et al*, 1996; Ferraresi P *et al*, 1997) no se conoce bien. Hay evidencias de que los niveles de PT afectan el fenotipo de resistencia a la APC, pero el mecanismo preciso no se conoce. En cuanto al alelo 4600G del gen del EPCR, se ha asociado *in vivo* e *in vitro* con niveles aumentados de sEPCR (Saposnik B *et al*, 2004; Medina P *et al*, 2004; Uitte de Willige S *et al*, 2004), lo cual podría ser debido a una aumentada sensibilidad al ADAM17 (Qu D *et al*, 2007). En el presente estudio, hemos comprobado que los niveles plasmáticos de PTag y PTact, y los niveles plasmáticos de F1+2 en todos los portadores de la mutación 20210A estaban significativamente más elevados en los portadores del alelo 20210A con VTE que sin VTE ($P=0,002$, $P<0,001$ y $P=0,002$ respectivamente), mientras que el tiempo de PT era significativamente menor en los portadores con VTE que sin VTE ($P=0,012$). Además, al distribuir los niveles de PTag en cuartiles, observamos que el riesgo trombótico aumentaba conforme aumentaban los niveles de PTag ($P=0,003$). Así, en los individuos portadores de la mutación 20210A, tener niveles elevados de PTag, PTact y F1+2, por encima del percentil 90, aumenta el riesgo de VTE (OR=3,8; IC 95%=1,8-8,3 para PTag y OR=3,0; IC 95%=1,4-6,6 para F1+2). Tras realizar un análisis multivariante introduciendo en el modelo tanto el percentil 90 de F1+2 como el percentil 90 de PTag, solamente el percentil 90 de PTag permaneció significativamente asociado con un mayor riesgo de VTE (OR=2,4; IC 95% =1,1-5,4), demostrando nuevamente que son los elevados niveles de PT los que aumentan el riesgo de VTE, vía el aumento en la generación de trombina.

En conclusión, pacientes con VTE y presencia de la mutación 20210A en el gen de la protrombina, portadores del haplotipo A3 (alelo 4600G) del gen del EPCR, reducen significativamente la edad en la que ocurre el primer evento trombótico y la probabilidad de estar libre de trombosis a la edad de 40 años. Tras el estudio familiar observamos que, en presencia del haplotipo A3 (alelo 4600G), el riesgo de VTE en familiares asintomáticos portadores de la mutación 20210A aumenta alrededor de 2 veces, debido a los niveles aumentados de sEPCR

asociados con este haplotipo. Por otra parte, en nuestro estudio observamos que en los familiares sintomáticos portadores de la mutación 20210A, los niveles plasmáticos de PT son significativamente mayores comparado con los familiares asintomáticos, confirmando el mecanismo molecular por el cual la mutación 20210A aumenta el riesgo trombótico. De forma que, en los familiares portadores de la mutación 20210A, tanto los elevados niveles de protrombina como los de sEPCR aumentan el riesgo trombótico.

5.2. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO C1418T DEL GEN DE LA TROMBOMODULINA, NIVELES PLASMÁTICOS DE PROTEÍNA C ACTIVADA Y TROMBOMODULINA SOLUBLE SOBRE EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO

El polimorfismo 1418C/T en el gen de la TM produce el cambio de Ala a Val en el residuo 455, que se localiza dentro del sexto dominio tipo EGF contiguo al dominio de unión a la trombina. Por ello, se pensó que podría ser un polimorfismo funcional, capaz de alterar la expresión y/o la estabilidad en la membrana de la proteína, y por tanto, estar asociado con el riesgo de VTE. En nuestro estudio observamos que entre los 1262 controles sanos estudiados, la frecuencia del alelo 1418T era 0,175, similar a la descrita en estudios previos: 0,169 (Heit JA *et al*, 2005), 0,180 (van der Velden PA *et al*, 1991) y 0,185 (Konstantoulas CJ *et al*, 2004). Entre los 1173 pacientes con VTE, la frecuencia del alelo 1418T fue 0,136, significativamente menor que en el grupo control ($P < 0,001$), aunque discrepante a las frecuencias observadas en estudios previos: similar a 0,154 (van der Velden PA *et al*, 1991), aunque menor que 0,196 (Heit JA *et al*, 2005).

Nuestros resultados demuestran claramente que la presencia del alelo 1418CT o del genotipo TT reduce de forma significativa el riesgo de VTE, incluso después de ajustar para la edad, sexo y la presencia de defectos trombofílicos. Es de resaltar que cuando dividimos a los individuos estudiados en dos subgrupos, según tuvieran menos de 50 años o bien 50 o más años, el efecto protector era incluso más pronunciado en los menores de 50 años, pero dejó de ser significativo en los de mayor edad.

Una posible explicación de las discrepancias observadas entre nuestros resultados y los de otros grupos puede estar en las diferentes poblaciones estudiadas. Hay que tener en cuenta las posibles diferencias en la frecuencia genotípica para una misma mutación o un factor de riesgo trombótico entre

población Caucásica, Asiática y Afroamericana, e incluso dentro de una misma etnia entre diferentes regiones geográficas. Así, para la asociación entre el polimorfismo A455V y el riesgo de infarto de miocardio e infarto cerebral, se han descrito diferentes resultados según el origen étnico de las poblaciones estudiadas, existiendo una relación opuesta entre factores de riesgo vascular y dicho polimorfismo según el origen (Cole JW *et al*, 2004 y Wu KK *et al*, 2001). Además, una diferencia puede estar también en la edad de los sujetos. Generalmente, las poblaciones estudiadas eran de mayor edad que las de este estudio. Y como nosotros hemos demostrado, la edad es un factor importante para el efecto protector observado, siendo los individuos de menor edad, portadores del alelo 1418T, los que parecen más protegidos frente al VTE. Es posible que la aparición de otros factores de riesgo con la edad enmascare el efecto protector de dicho alelo.

El efecto de la mutación A455V en la TM no se conoce con exactitud. Podría causar diferencias en la expresión de dicha proteína en la membrana endotelial, o bien tener una sensibilidad diferente según la presencia de uno u otro alelo al corte proteolítico de las proteasas encargadas de generar la forma soluble de TM, o también podrían darse los dos efectos simultáneamente o ninguno de ellos, y que el efecto de dicho polimorfismo fuese debido a otro polimorfismo en el gen de la TM con el que está en desequilibrio de unión. También podría ocurrir que a igual expresión y niveles de sTM, en presencia de uno u otro alelo se generaran diferentes variantes con diferentes eficiencias para la actividad como cofactor de la activación de la PC o de la sTM. Así, serían necesarios estudios en cultivos en presencia de las dos variantes para poder afirmar o negar alguna de estas hipótesis.

Nakabayashi y colaboradores (1999), en estudios de expresión con células COS-1 mostraron que tanto la variante TM455A como TM455V tenían propiedades cinéticas similares, tanto para la activación de la PC como para la unión a la trombina, descartando la hipótesis de diferente actividad como cofactor asociada a dicha mutación. Diferentes estudios demostraron que el polimorfismo A455V está asociado con los niveles plasmáticos de sTM, reflejando posiblemente los niveles de TM expresados en la membrana endotelial y la función anticoagulante (Salomaa V *et al*, 1999a). Aunque hay que tener en cuenta que los niveles de sTM también están alterados por factores diferentes a los genéticos, como edad, sexo, enfermedad renal o hepática e inflamación. (Takano S *et al*, 1990; Salomaa V *et al*, 1999a & 2001), por lo que es difícil interpretar el significado de los niveles de sTM en plasma.

En nuestro estudio, hemos cuantificado los niveles de sTM y APC, asociándolos con cada genotipo en un subgrupo de pacientes con VTE y controles. Los niveles de sTM y APC estaban significativamente más elevados en el grupo de pacientes que en el de controles ($P < 0,001$ en ambos casos), y además, cuando los niveles de sTM y APC se distribuyeron de acuerdo con el genotipo para el polimorfismo 1418C/T del gen de la TM, tanto en controles como en pacientes, se observó que los individuos portadores del genotipo TT tenían niveles de sTM significativamente reducidos, comparado con los del genotipo CC ($P < 0,001$ en ambos grupos). Para los niveles de APC no se observó ninguna asociación ni en el grupo de pacientes ni en el de controles, aunque existía una tendencia a mayores niveles de APC conforme aumentaba el número de alelos 1418T, pero sin significación estadística ($P = 0,225$ y $P = 0,173$ respectivamente). Estos resultados indicarían que el alelo 1418T se asocia con menores niveles de sTM y mayores niveles de APC circulante, lo cual sugiere que los niveles reducidos de sTM en los portadores del alelo T reflejarían mayores niveles de TM anclada en la membrana y, por tanto, mayor activación de PC. Desafortunadamente, no es posible comprobar esta hipótesis *in vivo*, ya que no es posible medir los niveles de TM en la membrana de la célula endotelial. Sin embargo, mediante estudios *in vitro*, cuantificamos los niveles de TM obtenidos a partir de cultivos con HUVECs, asociando después estos resultados con el genotipo para el polimorfismo 1418C/T en el gen de la TM de cada célula. Para cada cultivo, se cuantificaron los niveles de sTM en el sobrenadante del cultivo, que equivaldría a la sTM en plasma de controles, y en los lisados de membrana celular, que equivaldría a la TM anclada en la membrana. Los resultados obtenidos mostraron que, en presencia del alelo 1418T, los niveles de TM en el lisado celular aumentaban a medida que aumentaba el número de alelos 1418T ($P < 0,001$), mientras que los niveles de TM cuantificados en el sobrenadante del cultivo tendían a disminuir al aumentar el número de alelos 1418T ($P = 0,074$). Tanto los resultados del estudio caso-control, como los de las células HUVEC, nos permiten sugerir que el alelo 1418T aumenta la estabilidad de la TM en la membrana de la célula endotelial, siendo más difícil el corte proteolítico, reflejado por los elevados niveles de TM observados en la membrana, y los reducidos niveles de sTM observados en el sobrenadante de los cultivos de células HUVEC.

Así, concluimos que en nuestra población el polimorfismo A455V del gen de la TM está asociado con el VTE, de forma que el alelo 455V parece tener un efecto protector reduciendo significativamente el riesgo de VTE. Este efecto protector podría ser explicado mediante la asociación del alelo 455V con una

mayor estabilidad de la TM en la membrana de la célula endotelial, lo cual aumentaría la velocidad de activación de la proteína C y los niveles de APC, como se observa en el plasma de los portadores del alelo 455V.

5.3. IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA GLUCOSILCERAMIDA SINTASA (UGCG), Y SU ASOCIACIÓN CON LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GlcCer, PROTEÍNA C ACTIVADA Y EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO

El ensamblaje de las diferentes enzimas de la coagulación con sus cofactores y substratos ocurre sobre la superficie de la célula endotelial o de plaquetas. Estas superficies, compuestas principalmente por fosfolípidos, lípidos y glicolípidos, intervienen en las diferentes reacciones que ocurren durante la coagulación sanguínea, tanto en las vías anti- como procoagulantes. Así, variaciones en los niveles de estos lípidos, fosfolípidos o glicolípidos podrían favorecer un aumento o disminución en la generación de trombina, contribuyendo a un aumento o disminución del riesgo de trombosis venosa y/o arterial.

Diferentes estudios han demostrado que el glicolípido neutro GlcCer actúa favoreciendo la actividad anticoagulante de la PC, y que deficiencias en los niveles de este glicolípido aumentan el riesgo de VTE (Deguchi H *et al*, 2001 & 2002 & 2004; Yegneswaran S *et al*, 2003). También se ha demostrado que, niveles reducidos de APC son un factor de riesgo de VTE (España F *et al*, 2001). Pero, actúan de forma independiente? Para intentar contestar esta pregunta cuantificamos los niveles plasmáticos de APC y GlcCer en pacientes con VTE y controles. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron, como cabía esperar, que los pacientes con VTE tienen niveles significativamente reducidos tanto de APC como de GlcCer comparado con el grupo control. Tras estratificar los pacientes con VTE y controles de acuerdo con los tertiles para los niveles plasmáticos de APC y GlcCer, el riesgo de VTE aumentó tanto al descender la concentración de APC como la de GlcCer (OR=2,6;CI 95%=1,29-5,26 y OR=2,1;CI 95%=1,0-4,6 respectivamente), pero además, el riesgo de VTE fue mayor para el subgrupo con los niveles más bajos tanto para la APC como la GlcCer (OR=3,4;IC 95%=1,7-6,5). Estos resultados demuestran que niveles reducidos de GlcCer constituyen un factor de riesgo independiente para el VTE, y que además existe una interacción entre ambos parámetros *in vivo* que hacen que el riesgo aumente ante la deficiencia combinada de ambos.

A partir de este estudio, y la observación que en algunas familias de pacientes con VTE y niveles reducidos de GlcCer, varios de sus miembros tenían

deficiencias de GlcCer, nos planteamos la hipótesis de una posible causa genética que explicara las variaciones en los niveles plasmáticos de GlcCer. La UGCG es la enzima encargada de la síntesis de GlcCer. Así, la presencia de mutaciones funcionales en esta proteína podría alterar la actividad enzimática o expresión del gen que la codifica, modificando por tanto los niveles de GlcCer y permitiendo explicar el carácter hereditario de esta deficiencia.

Tras el análisis de las secuencias de DNA obtenidas para los 9 exones y regiones flanqueantes del gen de la UGCG, en los 34 individuos seleccionados con niveles reducidos de GlcCer, identificamos 20 mutaciones diferentes, de las cuales 9 no habían sido descritas previamente. Solo encontramos cierto grado de asociación entre genotipo-fenotipo-enfermedad para 4 mutaciones: la inserción de 10 pb en la región 5' UTR, la delección de 5 pb localizada en posición 17574 en el intrón 2 (rs3217582), la delección de 4pb en posición 27435 correspondiente al intrón 3 (rs35471909), y el polimorfismo G34991G localizado en el exón 8, aunque ninguna de ellas alcanzó significación estadística. Tras realizar el análisis multivariante, ajustando el riesgo trombótico por edad, sexo, principales defectos trombofílicos, y las cuatro mutaciones en el gen de la UGCG, solamente la presencia de la inserción de 10 pb en homocigosis en la región 5'UTR se asoció con una protección frente al riesgo de VTE. Así, individuos portadores de la inserción en homocigosis tienen alrededor de 3 veces menos riesgo de sufrir un evento trombótico que aquellos no portadores (OR=0.337; IC 95%=0.121-0.936).

El efecto protector de la ins de 10 pb sobre el VTE podría estar mediado por los niveles aumentados de GlcCer a los que se asocia este polimorfismo. Esta posibilidad viene apoyada por nuestros resultados de la estimación del riesgo trombótico asociado a los niveles de APC y GlcCer en un análisis multivariante en el que incluimos la inserción de 10 pb y los niveles de GlcCer y/o de APC. En este caso, el efecto protector de los niveles de GlcCer desaparecía en presencia de la mutación, pero no así el de los niveles de APC.

Mediante análisis *in silico* de la secuencia original comparada con la secuencia mutada, y empleando las bases de datos MatInspector (*Genomatix Software*) y Transfac, observamos que en presencia de la inserción de 10 pb se genera una nueva diana de unión para los factores de transcripción CTCF.01 y ETF en la región 5'UTR del UGCG. El factor de transcripción ETF (*Epidermal growth factor receptor-specific transcription factor*) es un factor de transcripción específico de genes con regiones promotoras sin cajas TATA, y funciona como activador de la expresión génica (Kageyama R *et al*, 1988 & 1989). El factor de

transcripción CTCF (*CCCTC binding factor zinc finger protein*) es una proteína de 82 kd, formada por 11 dominios tipo “*Zinc fingers*”, que le permiten la unión a diferentes secuencias de DNA y proteínas según la combinación de dominios que tengamos. Se ha demostrado que regula la expresión génica de lisozimas, del oncogen c-myc en vertebrados con una acción represora (Filippova GN *et al*, 1996), y del gen para el precursor de la proteína β -amiloide, a través de su región promotora, actuando como activador de la transcripción (Vostrov AA *et al*, 1997). Estos resultados podrían indicar que en presencia de la inserción, se activa la transcripción del gen UGCG, que conllevaría a un aumento en los niveles plasmáticos de GlcCer, aumentando la activación de la PC y protegiendo por tanto del VTE. Sin embargo, se necesitan más estudios funcionales para poder demostrar esta hipótesis.

5.4. ASOCIACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS A1 Y A3 DEL GEN DEL EPCR CON EL RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO PRECOZ

La aterosclerosis es una de las principales causas de mortalidad en los países desarrollados. El depósito de colesterol en la pared de la arteria, la inflamación, la proliferación y la migración celular juegan un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad. Existen diferentes factores de riesgo cardiovasculares asociados a la enfermedad cardiovascular, particularmente en pacientes que sufren un infarto de miocardio. Sin embargo, en presencia de estos factores de riesgo clásico no todos los individuos responden con trombosis arterial, lo que sugiere la existencia de otros factores de riesgo adicionales. En pacientes que han sufrido un infarto de miocardio a edad temprana, los factores de riesgo cardiovascular clásicos son menos frecuentes y han tenido menos tiempo para actuar. Por lo tanto, es posible que estos factores de riesgo adicionales jueguen un papel más importante en el desarrollo de la trombosis arterial a esta edad.

Puesto que la inflamación, el daño vascular y la coagulación sanguínea son reacciones en cadena en las que intervienen un gran número de proteínas, implicadas todas ellas en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, también deben existir mecanismos fisiológicos capaces de regular estos procesos simultáneamente. El sistema de la proteína C se ha revelado como uno de los mecanismos capaces de controlar la propagación de la inflamación y la coagulación sanguínea, al exhibir funciones tanto anticoagulantes y profibrinolíticas, como antiinflamatorias, neuroprotectoras y antiapoptóticas. Y aunque no está muy clara su implicación en la patogénesis de la trombosis arterial,

diferentes estudios han demostrado que deficiencias de PC o niveles reducidos de APC circulante son un factor de riesgo para el desarrollo de infarto de miocardio (España F *et al*, 2002b; Zorio E *et al*, 2006b). Por otra parte, diversos estudios han sugerido que la presencia de polimorfismos implicados en la vía anticoagulante de la PC, podrían modificar el riesgo trombótico en individuos con infarto de miocardio, sobre todo para mutaciones en el gen de la trombosmodulina y el EPCR. Puesto que el EPCR es uno de los componentes necesarios para la activación del sistema anticoagulante de la PC, nos planteamos investigar la asociación entre los haplotipos A1 y A3 del gen del EPCR y el riesgo trombótico asociado a individuos con infarto de miocardio precoz, como ya hicimos para pacientes con VTE portadores de la mutación 20210A.

Tras el genotipado de los dos polimorfismos marcadores de haplotipo en el gen del EPCR, se observó que tanto la frecuencia obtenida para el alelo 4600G (haplotipo A3) como para el alelo 4678C (haplotipo A1) eran significativamente más frecuentes en el grupo de controles que en el de pacientes con infarto de miocardio. Así, individuos portadores del haplotipo A1 o A3 del gen del EPCR tienen entre un 47% y un 15% menos riesgo de sufrir un infarto de miocardio a edad temprana, respectivamente (OR=0,53; IC 95%= 0,40-0,71 y OR=0,85; IC 95%=0,74-0,99 respectivamente). Además, este efecto protector aumentaba en presencia de ambos haplotipos, sugiriendo que los efectos protectores de los haplotipos A1 y A3 parecen ser aditivos.

Al contrario que los resultados observados por Ireland y colaboradores (2005), la protección del haplotipo A3 frente al infarto de miocardio se mantenía en un subgrupo de pacientes con infarto de miocardio y síndrome metabólico o diabetes, así como al realizar el análisis multivariante ajustando por los principales factores de riesgo clásicos. Estas diferencias pueden deberse a la edad del grupo de estudio, siendo en nuestro estudio mucho menor.

Por otra parte, se ha demostrado que el haplotipo A1 (alelo 4678C) del gen del EPCR reduce el riesgo trombótico posiblemente debido a los elevados niveles de APC asociados a este haplotipo (Medina P *et al*, 2004 & 2005). Así, el mecanismo por el cual la presencia del alelo 4678C (haplotipo A1) disminuye el riesgo de infarto de miocardio a edad temprana parece ser similar, puesto que además de ejercer actividades anticoagulantes, el APC exhibe actividades antiapoptóticas, antiinflamatorias y neuroprotectoras, inhibiendo la liberación de citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión, y la activación celular, etc, que permiten la supervivencia celular y recuperación del daño vascular (Esmon CT &

Fukudome K, 1995a; Esmon CT *et al*, 1999a; Joyce DE *et al*, 2002; España F *et al*, 2005; Mosnier LO *et al*, 2007b; Medina P *et al*, 2008). Nuestros resultados apoyan claramente este mecanismo. Al cuantificar los niveles de APC tanto en el grupo control como en el de pacientes con infarto de miocardio precoz, observamos que los niveles de APC aumentaban conforme aumentaba el número de alelos 4678C (haplotipo A1), tanto en controles como en pacientes, como ya había sido descrito previamente para pacientes con VTE (Medina P *et al*, 2004). Además, tras estratificar los niveles de acuerdo a los cuartiles de APC en el grupo control, el riesgo de infarto de miocardio aumentó conforme disminuía el cuartil. Sin embargo, este efecto protector del haplotipo A1 desaparecía al realizar el análisis multivariante ajustando por niveles plasmáticos de APC elevados, demostrando que son los elevados niveles de APC los que protegen frente al infarto de miocardio, y no la mutación por sí misma.

El mecanismo por el cual la presencia del alelo 4600G (haplotipo A3) disminuye el riesgo de infarto de miocardio a edad temprana se desconoce. Una explicación para este papel protector, podría ser la observación de que el sEPCR es capaz de unir tanto FVII como FVIIa con similar afinidad con la que une PC y APC (Ghosh S *et al*, 2007; López-Sagaseta J *et al*, 2007) y que, tras la formación del complejo la capacidad del FVIIa para activar al FX está reducida, incluso cuando está unido al TF, sugiriendo que el sEPCR puede jugar un papel anticoagulante que es más relevante en portadores del haplotipo A3. Una serie de importantes actividades antiinflamatorias de la APC requieren la presencia de EPCR anclado a la membrana (Mosnier LO *et al*, 2007b). No sabemos si el sEPCR conserva alguna de estas actividades. No obstante, el hecho de que el efecto protector del haplotipo A3 desaparezca parcialmente después de ajustar para niveles de sEPCR podría indicar que el efecto es vía elevados niveles de sEPCR.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que, tanto el haplotipo A1 como el haplotipo A3 del gen del EPCR disminuyen el riesgo de sufrir un infarto de miocardio a edad temprana, y aunque el mecanismo por el cual ejercen esta acción protectora no se conoce con exactitud, parece ser debido a los elevados niveles de APC y sEPCR circulantes asociados con cada haplotipo respectivamente, ambos con un reconocido efecto antiinflamatorio.

5.5. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C EN LA ENFERMEDAD DE BEHÇET Y SU CORRELACIÓN CON EL RIESGO DE TROMBOEMBOLISMO VENOSO

Los resultados obtenidos en el presente estudio, en relación con la asociación de los dos haplotipos del gen del EPCR con el riesgo de VTE en pacientes con la enfermedad de Behçet, debemos analizarlos con cautela y considerarlos como muy preliminares, dado el reducido número de pacientes con la enfermedad de Behçet estudiados, y puesto que es una enfermedad de baja incidencia en nuestra población.

La enfermedad de Behçet se define como una enfermedad inflamatoria con curso crónico y origen desconocido que afecta a los vasos sanguíneos, produciendo una vasculitis sistémica recurrente y una respuesta autoinmune. Puesto que el sistema de la PC posee funciones anticoagulantes y citoprotectoras, es posible que su alteración esté implicada en la progresión de la enfermedad de Behçet. En un estudio previo (Navarro S *et al*, 2004) se demostró que niveles reducidos de APC circulante eran un factor de riesgo para la enfermedad de Behçet, demostrando una asociación entre el sistema de la PC y la enfermedad. Por ello, puesto que los haplotipos A1 y A3 del gen del EPCR están asociados con los niveles de APC y pueden modificar el riesgo de VTE, es posible que estos haplotipos estén asociados con el mayor riesgo de VTE observado en pacientes con en la enfermedad de Behçet. Tras el genotipado de los dos polimorfismos marcadores de haplotipo en el gen del EPCR, A4600G (haplotipo A3) y G4678C (haplotipo A1), en un grupo de pacientes con la enfermedad de Behçet y un grupo control, no observamos ningún efecto de asociación entre ser portador de estos haplotipos y la enfermedad de Behçet. Se observó una tendencia protectora en presencia del alelo 4600G (haplotipo A3), de forma que individuos portadores del haplotipo A3 tienen 2 veces menos riesgo de padecer la enfermedad de Behçet (OR=0,508; IC95%=0,133-1,937), comparado con aquellos que no lo portan, pero que no alcanza la significación estadística, posiblemente, y como ya hemos descrito al inicio, debido a las características preliminares del estudio. Además, al realizar el análisis multivariante, y ajustar el riesgo de padecer la enfermedad de Behçet tanto por la presencia del alelo 4600G como por niveles reducidos de APC, este riesgo se mantuvo. Estos resultados nos hacen pensar en un efecto del haplotipo A3 independiente al efecto protector asociado a niveles aumentados de APC.

Si realizamos el análisis de los resultados solamente en el grupo de pacientes con la enfermedad de Behçet, y atendiendo a su historia de enfermedad trombótica,

tanto la presencia del alelo 4600G, y en menor medida, la del alelo 4678C presentan una tendencia protectora frente a la trombosis. De forma que en pacientes con la enfermedad de Behçet, ser portador del haplotipo A3 protege unas 3,3 veces frente al VTE (OR=0,30; IC95%=0,015-6,048), y unas 1,9 veces en presencia del haplotipo A1 (OR=0,522; IC 95%=0,097-2,810), comparado con aquellos pacientes no portadores de dichos haplotipos. De nuevo, hay que tener en cuenta que estas diferencias no son significativas, debido posiblemente pequeño número de muestras analizadas.

Estos resultados preliminares para la enfermedad de Behçet serían similares a los obtenidos para pacientes con infarto de miocardio a edad temprana (apartado 4.4), discutidos anteriormente, en los que tanto la presencia del haplotipo A1 como el haplotipo A3 del gen del EPCR disminuye el riesgo de sufrir un infarto de miocardio a edad temprana (Medina P *et al*, 2008). El efecto protector del haplotipo A1 sobre la enfermedad de Behçet estaría asociado a través de los elevados niveles de APC circulante, que ya habíamos demostrado en un estudio anterior (Navarro S *et al*, 2004). El efecto protector del haplotipo A3 sobre la enfermedad de Behçet se desconoce. Tal y como describimos en el VTE y el infarto de miocardio en apartados anteriores, podría estar asociado a los elevados niveles de sEPCR asociados a este haplotipo, con una acción antiinflamatoria reconocida. Esta hipótesis estaría en parte apoyada por los resultados obtenidos en el presente estudio sobre el efecto protector del haplotipo A3 frente al VTE, que es independiente de los niveles elevados de APC.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que tanto el haplotipo A1 como el haplotipo A3 del gen del EPCR parecen disminuir el riesgo de sufrir un VTE en pacientes con la enfermedad de Behçet, y aunque el mecanismo por el cual ejercen esta acción protectora no se conoce con exactitud, en el caso del haplotipo A1 el efecto podría ser debido a los elevados niveles de APC circulante asociado con dicho haplotipo.

6. – CONCLUSIONES

*“Aún falta mucho camino por recorrer”
(B. Obama)*

Las conclusiones obtenidas de los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral, son:

- 1. -** El haplotipo A3 del gen del EPCR reduce significativamente la edad del primer evento trombótico y la probabilidad de estar libre de trombosis a la edad de 40 años en individuos portadores de la mutación 20210A en el gen de la protrombina.
- 2. -** El haplotipo A3 aumenta el riesgo de tromboembolismo venoso en portadores de la mutación 20210A del gen de la protrombina, posiblemente debido a los niveles aumentados de EPCR soluble que hemos observado asociados con este haplotipo.
- 3. -** El alelo 1418T del gen de la trombomodulina reduce significativamente el riesgo de tromboembolismo venoso. Este efecto protector puede ser debido a la asociación de este alelo con una mayor estabilidad de la trombomodulina en la membrana de la célula endotelial. Ello viene apoyado por los estudios en células endoteliales de cordón umbilical, en los que se observa que las células portadoras del alelo 1418T muestran un elevado nivel de TM en la membrana y un menor nivel en el sobrenadante del cultivo.
- 4. -** Niveles reducidos de GlcCer y de APC constituyen un factor de riesgo independiente para el tromboembolismo venoso. Además, nuestros resultados sugieren la existencia de una interacción entre niveles reducidos de GlcCer y de proteína C activada, ya que la deficiencia combinada de ambas proteínas eleva el riesgo individual de cada una de ellas.
- 5. -** La inserción de 10 pb en homocigosis en la región 3'UTR del gen de la glucosilceramida sintasa se asocia con niveles aumentados de GlcCer, y con una reducción del riesgo trombótico.
- 6. -** Los haplotipos A1 y A3 del gen del EPCR disminuyen el riesgo de infarto de miocardio precoz. Este efecto protector se debe, posiblemente, a los elevados niveles circulantes de proteína C activada y EPCR soluble asociados con estos haplotipos.

7. - Los resultados preliminares para la enfermedad de Behçet muestran que los haplotipo A1 y A3 del gen del EPCR parecen disminuir el riesgo de sufrir un tromboembolismo venoso en pacientes con esta enfermedad. Aunque el mecanismo por el cual ejercen esta acción protectora no se conoce con exactitud, en el caso del haplotipo A1 el efecto podría ser debido a los elevados niveles de proteína C activada circulante asociados con dicho haplotipo.

8. - Todos estos resultados reflejan las distintas funciones que pueden ejercer tanto la proteína C activada como el EPCR soluble. Así, la proteína C activada muestra efectos anticoagulantes y citoprotectores en la trombosis venosa y arterial, mientras que el EPCR soluble puede expresar una función procoagulante en la trombosis venosa y una función citoprotectora en la trombosis arterial.

7. – BIBLIOGRAFÍA

*“Si consigo ver más lejos,
es porque he conseguido auparme a hombros de gigantes”.
(Isaac Newton)*

- Abdelkafi M, Leulliot N, Baumruk V, Bednárová L, Turpin P, Namane A, et al. Structural features of the UCCG and UGCG tetraloops in very short hairpins as evidenced by optical spectroscopy. *Biochemistry*. 1998 May;37(21):7878-84.
- Aiach M, Gandrille S, Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Fiessinger J. Molecular abnormalities responsible for thrombosis. Genetic aspects. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1992;34(4):279-85.
- Aiach M, Borgel D, Gaussem P, Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Gandrille S. Protein C and protein S deficiencies. *Semin Hematol*. 1997 Jul;34(3):205-16.
- Aiach M, Nicaud V, Alhenc-Gelas M, Gandrille S, Arnaud E, Amiral J, et al. Complex association of protein C gene promoter polymorphism with circulating protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Jun;19(6):1573-6.
- Aiach M, Alhenc-Gelas M, Borgel D, Emmerich J, Gandrille S, Picard V. Coagulation factor mutations and thrombosis. *Med Sci (Paris)*. 2006 Nov;22(11):985-9.
- Aitchison R, Chu P, Cater DR, Harris RJ, Powell RJ. Defective fibrinolysis in Behçet's syndrome: significance and possible mechanisms. *Ann Rheum Dis*. 1989 Jul;48(7):590-3.
- Akpolat T, Koç Y, Yeniay I, Akpek G, Güllü I, Kansu E, et al. Familial Behçet's disease. *Eur J Med*. 1992 Nov;1(7):391-5.
- Alcaraz A, España F, Sánchez-Cuenca J, Zuazu I, Estellés A, Aznar J, et al. Activation of the protein C pathway in acute sepsis. *Thromb Res*. 1995 Jul;79(1):83-93.
- Aleksic N, Ahn C, Wang Y, Juneja H, Folsom A, Boerwinkle E, et al. Factor XIII A Val34Leu polymorphism does not predict risk of coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Feb;22(2):348-52.
- Alhenc-Gelas M, Arnaud E, Nicaud V, Aubry M, Fiessinger J, Aiach M, et al. Venous thromboembolic disease and the prothrombin, methylene tetrahydrofolate reductase and factor V genes. *Thromb Haemost*. 1999a Apr;81(4):506-10.
- Alhenc-Gelas M, Nicaud V, Gandrille S, van Dreden P, Amiral J, Aubry M, et al. The factor V gene A4070G mutation and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 1999b Feb;81(2):193-7.
- Alhenc-Gelas M, Gandrille S, Aubry M, Aiach M. Thirty-three novel mutations in the protein C gene. French INSERM network on molecular abnormalities responsible for protein C and protein S. *Thromb Haemost*. 2000 Jan;83(1):86-92.
- Alhenc-Gelas M, Aiach M, de Moerloose P. Venous thromboembolic disease: risk factors and laboratory investigation. *Semin Vasc Med*. 2001;1(1):81-8.

- Alhenc-Gelas M, Aiach M. [Genetics of venous thromboembolism]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2003 Nov;96(11):1111-5.
- Alhenc Gelas M, Juin F, de Raucourt E, Gandrille S, Borgel D, Aiach M. Influence of PROS1 gene mutations affecting protein S amino-acid 275 on plasma free protein S measurement. *Thromb Haemost.* 2007 Apr;97(4):678-80.
- Altınbaş A, Aytemur K, Tokgözoğlu L, Öztürk M, Koşar A, Haznedaroğlu I, et al. Hyperhomocysteinaemia and activated protein C resistance in Behçet's disease. *J Intern Med.* 2000 Sep;248(3):267-8.
- Archipoff G, Beretz A, Freyssinet J, Klein-Soyer C, Brisson C, Cazenave J. Heterogeneous regulation of constitutive thrombomodulin or inducible tissue-factor activities on the surface of human saphenous-vein endothelial cells in culture following stimulation by interleukin-1, tumour necrosis factor, thrombin or phorbol ester. *Biochem J.* 1991 Feb;273 (Pt 3):679-84.
- Arnaud E, Nicaud V, Poirier O, Rendu F, Alhenc-Gelas M, Fiessinger J, et al. Protective effect of a thrombin receptor (protease-activated receptor 1) gene polymorphism toward venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Feb;20(2):585-92.
- Auro K, Komulainen K, Alanne M, Silander K, Peltonen L, Perola M, et al. Thrombomodulin gene polymorphisms and haplotypes and the risk of cardiovascular events: a prospective follow-up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Apr;26(4):942-7.
- Auro K, Alanne M, Kristiansson K, Silander K, Kuulasmaa K, Salomaa V, et al. Combined effects of thrombosis pathway gene variants predict cardiovascular events. *PLoS Genet.* 2007 Jul;3(7):e120.
- Aznar J, Estellés A, Vila V, Regañón E, España F, Villa P. Inherited fibrinolytic disorder due to an enhanced plasminogen activator level. *Thromb Haemost.* 1984 Oct;52(2):196-200.
- Aznar J, Dasi A, Espana F, Estelles A. Fibrinolytic study in a homozygous protein C deficient patient. *Thromb Res.* 1986 May 1;42(3):313-22.
- Aznar J, Estellés A, Tormo G, Sapena P, Tormo V, Blanch S, et al. Plasminogen activator inhibitor activity and other fibrinolytic variables in patients with coronary artery disease. *Br Heart J.* 1988 May;59(5):535-41.
- Aznar J, España F, Estellés A, Royo M. Heparin stimulation of the inhibition of activated protein C and other enzymes by human protein C inhibitor--influence of the molecular weight of heparin and ionic strength. *Thromb Haemost.* 1996 Dec;76(6):983-8.
- Aznar J, Villa P, España F, Estellés A, Grancha S, Falcó C. Activated protein C resistance phenotype in patients with antiphospholipid antibodies. *J Lab Clin Med.* 1997 Aug;130(2):202-8.

Aznar J, Villa P, España F. Functional diagnosis of activated protein C resistance in patients with antiphospholipid antibodies. *Clin Appl Thromb Hemost.* 1999 Apr;5(2):139-40.

Aznar J, Vayá A, Estellés A, Mira Y, Seguí R, Villa P, et al. Risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A variant and factor V Leiden and their interaction with oral contraceptives. *Haematologica.* 2000 Dec;85(12):1271-6.

Badimon L. Atherosclerosis and thrombosis: lessons from animal models. *Thromb Haemost.* 2001a Jul;86(1):356-65.

Badimon L. New challenges in the etiopathogenesis of atherothrombosis. *Cerebrovasc Dis.* 2001b;11 Suppl 1:80-4.

Bae J, Yang L, Rezaie A. Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb;104(8):2867-72.

Bang D, Ji H, Choi Y, Lee S. Absence of lupus anticoagulants in Behçet's disease. *Yonsei Med J.* 1991 Dec;32(4):326-9.

Barbui T, Finazzi G, Mussoni L, Riganti M, Donati MB, Colucci M, et al. Hereditary dysfunctional protein C (protein C Bergamo) and thrombosis. *Lancet.* 1984 Oct 6;2(8406):819.

Bartha K, Brisson C, Archipoff G, de la Salle C, Lanza F, Cazenave J, et al. Thrombin regulates tissue factor and thrombomodulin mRNA levels and activities in human saphenous vein endothelial cells by distinct mechanisms. *J Biol Chem.* 1993 Jan;268(1):421-9.

Bayraktar Y, Soyulu A, Balkanci F, Gedikoğlu G, Cakmakçi M, Sayek I. Arterial thrombosis leading to intestinal infarction in a patient with Behçet's disease associated with protein C deficiency. *Am J Gastroenterol.* 1998 Dec;93(12):2556-8.

Beaulieu L, Church F. Activated protein C promotes breast cancer cell migration through interactions with EPCR and PAR-1. *Exp Cell Res.* 2007 Feb;313(4):677-87.

Benamour S. [Rheumatic manifestations of Behçet's disease]. *Ann Med Interne (Paris).* 1999 Nov;150(7):562-70.

Beret A, Klein-Soyer C, Archipoff G, Camilla C, Brisson C, Freyssinet J, et al. Modulation by cytokines of leukocyte-endothelial cell interactions. Implications for thrombosis. *Biorheology.* 1990;27(3-4):455-60.

Bernard G, Ely E, Wright T, Fraiz J, Stasek JJ, Russell J, et al. Safety and dose relationship of recombinant human activated protein C for coagulopathy in severe sepsis. *Crit Care Med.* 2001a Nov;29(11):2051-9.

- Bernard G, Vincent J, Laterre P, LaRosa S, Dhainaut J, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 2001b Mar;344(10):699-709.
- Berrettini M, Schleef R, España F, Loskutoff D, Griffin J. Interaction of type 1 plasminogen activator inhibitor with the enzymes of the contact activation system. *J Biol Chem*. 1989 Jul;264(20):11738-43.
- Bertina RM. Hereditary deficiencies of protein C and protein S. In: Aznar J, España F, eds. *Protein C pathway*. Barcelona: Springer-Verlag, 1991:111-20.
- Beutler E, West C. Polymorphisms in glucosylceramide (glucocerebroside) synthase and the Gaucher disease phenotype. *Isr Med Assoc J*. 2002 Nov;4(11):986-8.
- Beutler E. Lysosomal storage diseases: natural history and ethical and economic aspects. *Mol Genet Metab*. 2006 Jul;88(3):208-15.
- Biguzzi E, Merati G, Liaw P, Bucciarelli P, Oganessian N, Qu D, et al. A 23bp insertion in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene impairs EPCR function. *Thromb Haemost*. 2001 Oct;86(4):945-8.
- Bilbault P, Lavaux T, Launoy A, Gaub M, Meyer N, Oudet P, et al. Influence of drotrecogin alpha (activated) infusion on the variation of Bax/Bcl-2 and Bax/Bcl-xl ratios in circulating mononuclear cells: a cohort study in septic shock patients. *Crit Care Med*. 2007 Jan;35(1):69-75.
- Blann A. Endothelial cell activation, injury, damage and dysfunction: separate entities or mutual terms? *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2000 Oct;11(7):623-30.
- Boehme M, Deng Y, Raeth U, Bierhaus A, Ziegler R, Stremmel W, et al. Release of thrombomodulin from endothelial cells by concerted action of TNF-alpha and neutrophils: in vivo and in vitro studies. *Immunology*. 1996 Jan;87(1):134-40.
- Boerger L, Morris P, Thurnau G, Esmon C, Comp P. Oral contraceptives and gender affect protein S status. *Blood*. 1987 Feb;69(2):692-4.
- Boinot C, Borgel D, Kitzis A, Guicheteau M, Aiach M, Alhenc-Gelas M. Familial thrombophilia is an oligogenetic disease: involvement of the prothrombin G20210A, PROC and PROS gene mutations. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003 Feb;14(2):191-6.
- Boldin SA, Futerman AH. Up-regulation of glucosylceramide synthesis upon stimulation of axonal growth by basic fibroblast growth factor. Evidence for post-translational modification of glucosylceramide synthase. *J Biol Chem*. 2000 Apr 7;275(14):9905-9.

- Borgel D, Duchemin J, Alhenc-Gelas M, Matheron C, Aiach M, Gandrille S. Molecular basis for protein S hereditary deficiency: genetic defects observed in 118 patients with type I and type IIa deficiencies. The French Network on Molecular Abnormalities Responsible for Protein C and Protein S Deficiencies. *J Lab Clin Med.* 1996 Aug;128(2):218-27.
- Bourin MC, Lindahl U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochem J.* 1993 Jan 15;289 (Pt 2):313-30.
- Brisson C, Archipoff G, Hartmann M, Hanau D, Beretz A, Freyssinet J, et al. Antibodies to thrombomodulin induce receptor-mediated endocytosis in human saphenous vein endothelial cells. *Thromb Haemost.* 1992 Dec;68(6):737-43.
- Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem.* 2000 Jun 9;275(23):17221-4.
- Calikoğlu E, Oztaş M, Sengül N, Adam B, Gürer M. Serum homocysteine level in Behçet's disease. *Haematologia (Budap).* 2002;32(3):219-24.
- Campbell W, Lazoura E, Okada N, Okada H. Inactivation of C3a and C5a octapeptides by carboxypeptidase R and carboxypeptidase N. *Microbiol Immunol.* 2002;46(2):131-4.
- Carrell RW. Coagulation, anticoagulation and thrombosis: molecular mechanisms. *Haematologica.* 2004 October;89 (Suppl 1):100-4.
- Castelló R, España F, Vázquez C, Fuster C, Almenar S, Aznar J, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in breast cancer patients and its association with tissue PAI-1 levels and tumor severity. *Thromb Res.* 2006;117(5):487-92.
- Castelló R, Landete J, España F, Vázquez C, Fuster C, Almenar S, et al. Expression of plasminogen activator inhibitors type 1 and type 3 and urokinase plasminogen activator protein and mRNA in breast cancer. *Thromb Res.* 2007;120(5):753-62.
- Chafa O, Fischer A, Meriane F, Chellali T, Sternberg C, Otmani F, et al. Behçet syndrome associated with protein S deficiency. *Thromb Haemost.* 1992 Jan;67(1):1-3.
- Chajek T, Fainaru M. Behçet's disease. Report of 41 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 1975 May;54(3):179-96.
- Chao T, Li Y, Chen J, Wu H, Shi G, Tsai W, et al. Relation of thrombomodulin gene polymorphisms to acute myocardial infarction in patients. *Am J Cardiol.* 2004 Jan;93(2):204-7.
- Chatterjee S, Shi W, Wilson P, Mazumdar A. Role of lactosylceramide and MAP kinase in the proliferation of proximal tubular cells in human polycystic kidney disease. *J Lipid Res.* 1996 Jun;37(6):1334-44.

- Chatterjee S, Bhunia A, Snowden A, Han H. Oxidized low density lipoproteins stimulate galactosyltransferase activity, ras activation, p44 mitogen activated protein kinase and c-fos expression in aortic smooth muscle cells. *Glycobiology*. 1997 Jul;7(5):703-10.
- Chatterjee S. Sphingolipids in atherosclerosis and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 Oct;18(10):1523-33.
- Cheng T, Liu D, Griffin J, Fernández J, Castellino F, Rosen E, et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med*. 2003 Mar;9(3):338-42.
- Cheng T, Petraglia A, Li Z, Thiyagarajan M, Zhong Z, Wu Z, et al. Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nat Med*. 2006 Nov;12(11):1278-85.
- Christie P, Edelberg J, Picard M, Foulkes A, Mamuya W, Weiler-Guettler H, et al. A murine model of myocardial microvascular thrombosis. *J Clin Invest*. 1999 Sep;104(5):533-9.
- Chujor C, Feingold K, Elias P, Holleran W. Glucosylceramide synthase activity in murine epidermis: quantitation, localization, regulation, and requirement for barrier homeostasis. *J Lipid Res*. 1998 Feb;39(2):277-85.
- Clouse LH, Comp PC. The regulation of hemostasis: the protein C system. *N Engl J Med*. 1986 May 15;314(20):1298-304.
- Collen D. The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost*. 1999 Aug;82(2):259-70.
- Conway E, Rosenberg R. Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. *Mol Cell Biol*. 1988 Dec;8(12):5588-92.
- Conway E, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vriese A, et al. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med*. 2002 Sep;196(5):565-77.
- Coughlin S, Camerer E. PARticipation in inflammation. *J Clin Invest*. 2003 Jan;111(1):25-7.
- Crespo P, Silvestre D, Gil G, Maccioni H, Daniotti J, Caputto B. c-Fos activates glucosylceramide synthase and glycolipid synthesis in PC12 cells. *J Biol Chem*. 2008 Nov;283(45):31163-71.
- Criteria for diagnosis of Behçet's disease. International Study Group for Behçet's Disease. *Lancet*. 1990 May;335(8697):1078-80.
- Crockett-Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J Leukoc Biol*. 1998 Jan;63(1):1-14.

- D**ahlbäck B, Stenflo J. The protein C anticoagulant system. In: Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H, eds. *The molecular Basis of Blood Diseases*. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 2001:614-56.
- Dahlbäck B, Villoutreix BO. Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J Thromb Haemost*. 2003 Jul;1(7):1525-34.
- Dahlbäck B. Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *Int J Hematol*. 2004 Feb;79(2):109-16.
- Davie EW. Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thromb Haemost*. 1995 Jul;74(1):1-6.
- De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, et al. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med*. 1999 Sep 9;341(11):801-6.
- Değer O, Orem A, Akyol N, Bahadır S, Yildirmis S. Polymorphonuclear leukocyte elastase levels in patients with Behçet's disease. *Clin Chim Acta*. 1995 May;236(2):129-34.
- Deguchi H, Fernández J, Hackeng T, Banka C, Griffin JH. Cardiolipin is a normal component of human plasma lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb;97(4):1743-8.
- Deguchi H, Fernández JA, Pabinger I, Heit JA, Griffin JH. Plasma glucosylceramide deficiency as potential risk factor for venous thrombosis and modulator of anticoagulant protein C pathway. *Blood*. 2001 Apr 1;97(7):1907-14.
- Deguchi H, Fernández JA, Griffin JH. Neutral glycosphingolipid-dependent inactivation of coagulation factor Va by activated protein C and protein S. *J Biol Chem*. 2002 Mar 15;277(11):8861-5.
- Deguchi H, Yegneswaran S, Griffin JH. Sphingolipids as bioactive regulators of thrombin generation. *J Biol Chem*. 2004 Mar 26;279(13):12036-42.
- Deguchi H, Bouma B, Middeldorp S, Lee Y, Griffin JH. Decreased plasma sensitivity to activated protein C by oral contraceptives is associated with decreases in plasma glucosylceramide. *J Thromb Haemost*. 2005 May;3(5):935-8.
- Deigner HP, Claus R, Bonaterra GA, Gehrke C, Bibak N, Blaess M, et al. Ceramide induces aSMase expression: implications for oxLDL-induced apoptosis. *Faseb J*. 2001 Mar;15(3):807-14.
- Demirer S, Sengül N, Yerdel M, Tüzüner A, Ulus A, Gürler A, et al. Haemostasis in patients with Behçet's disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000 Jun;19(6):570-4.

Dennis M, Downey C, Brufatto N, Nesheim M, Stevenson K, Toh C. Prothrombinase enhancement through quantitative and qualitative changes affecting very low density lipoprotein in complex with C-reactive protein. *Thromb Haemost.* 2004 Mar;91(3):522-30.

Diaz-Font A, Chabás A, Grinberg D, Vilageliu L. RNAi-mediated inhibition of the glucosylceramide synthase (GCS) gene: A preliminary study towards a therapeutic strategy for Gaucher disease and other glycosphingolipid storage diseases. *Blood Cells Mol Dis.*37(3):197-203.

DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, Suyang H, Ghosh S, et al. Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr;16(4):1295-304.

Díez N, Montes R, Alonso A, Medina P, Navarro S, España F, et al. Association of increased fibrinogen concentration with impaired activation of anticoagulant protein C. *J Thromb Haemost.* 2006 Feb;4(2):398-402.

Doggen C, Cats V, Bertina R, Rosendaal F. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation.* 1998a Mar;97(11):1037-41.

Doggen C, Kunz G, Rosendaal F, Lane D, Vos H, Stubbs P, et al. A mutation in the thrombomodulin gene, 127G to A coding for Ala25Thr, and the risk of myocardial infarction in men. *Thromb Haemost.* 1998b Nov;80(5):743-8.

Donato J, Marcondes S, Antunes E, Nogueira M, Nader H, Dietrich C, et al. Role of chondroitin 4-sulphate as a receptor for polycation induced human platelet aggregation. *Br J Pharmacol.* 1996 Dec;119(7):1447-53.

Drickamer K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem.* 1988 Jul;263(20):9557-60.

Duchemin J, Pittet J, Tartary M, Béguin S, Gaussem P, Alhenc-Gelas M, et al. A new assay based on thrombin generation inhibition to detect both protein C and protein S deficiencies in plasma. *Thromb Haemost.* 1994 Mar;71(3):331-8.

Eitzman D, Bodary P, Shen Y, Khairallah C, Wild S, Abe A, et al. Fabry disease in mice is associated with age-dependent susceptibility to vascular thrombosis. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Feb;14(2):298-302.

Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Gandrille S, Fiessinger J, Aiach M. [A new cause of familial thrombophilia: resistance to the effect of activated protein C]. *Presse Med.* 1994a Sep;23(28):1285-7.

Emmerich J, Chadeuf G, Alhenc-Gelas M, Gouault-Heilman M, Toulon P, Fiessinger J, et al. Molecular basis of antithrombin type I deficiency: the first large in-frame deletion and two novel mutations in exon 6. *Thromb Haemost.* 1994b Oct;72(4):534-9

- Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Gandrille S, Guichet C, Fiessinger J, Aiach M. Mechanism of protein C deficiency in a patient with arginine 358 alpha 1-antitrypsin (Pittsburgh mutation): role in the maintenance of hemostatic balance. *J Lab Clin Med.* 1995 Apr;125(4):531-9.
- Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Aillaud M, Juhan-Vague I, Jude B, Garcin J, et al. Clinical features in 36 patients homozygous for the ARG 506-->GLN factor V mutation. *Thromb Haemost.* 1997 Apr;77(4):620-3.
- Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, et al. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism--pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2001 Sep;86(3):809-16. Erratum in: *Thromb Haemost* 2001 Dec;86(6):1598.
- Esmon CT. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science.* 1987a Mar;235(4794):1348-52.
- Esmon CT, Taylor FJ, Hinshaw L, Chang A, Comp P, Ferrell G, et al. Protein C, isolation and potential use in prevention of thrombosis. *Dev Biol Stand.* 1987b;67:51-7.
- Esmon CT. The protein C anticoagulant pathway. *Arterioscler Thromb.* 1992 Feb;12(2):135-45.
- Esmon CT, Fukudome K. Cellular regulation of the protein C pathway. *Semin Cell Biol.* 1995a Oct;6(5):259-68.
- Esmon CT, Fukudome K. Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR). The structural and functional conservation in human, bovine, and murine EPCR. *J Biol Chem.* 1995b Mar 10;270(10):5571-7.
- Esmon CT, Gu JM, Xu J, Qu D, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S. Regulation and functions of the protein C anticoagulant pathway. *Haematologica.* 1999a Apr;84(4):363-8.
- Esmon CT, Xu J, Gu JM, Qu D, Laszik Z, Ferrell G, et al. Endothelial protein C receptor. *Thromb Haemost.* 1999b Aug;82(2):251-8.
- Esmon CT. Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta.* 2000a Mar 7;1477(1-2):349-60.
- Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost.* 2000b May;83(5):639-43.
- Esmon CT. Protein C pathway in sepsis. *Ann Med.* 2002;34(7-8):598-605.
- Esmon CT. Coagulation and inflammation. *J Endotoxin Res.* 2003a;9(3):192-8.
- Esmon CT. The protein C pathway. *Chest.* 2003b Sep;124(3 Suppl):26S-32S.

- Esmon CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas* 2008; 61(1-2):122-31.
- España F, Estelles A, Aznar J, Gilabert J. Assay of protein C in human plasma: comparison of amidolytic, coagulation, and immunochemical assays. *Thromb Res.* 1986 Dec 15;44(6):771-82.
- España F, Berrettini M, Griffin JH. Purification and characterization of plasma protein C inhibitor. *Thromb Res.* 1989 Aug;55(3):369-84.
- España F, Griffin JH. Determination of functional and antigenic protein C inhibitor and its complexes with activated protein C in plasma by ELISA's. *Thromb Res.* 1989 Sep;55(6):671-82.
- España F, Vicente V, Tabernero D, Scharrer I, Griffin J. Determination of plasma protein C inhibitor and of two activated protein C-inhibitor complexes in normals and in patients with intravascular coagulation and thrombotic disease. *Thromb Res.* 1990 Aug;59(3):593-608.
- España F, Estellés A, Griffin JH, Aznar J. Interaction of plasma kallikrein with protein C inhibitor in purified mixtures and in plasma. *Thromb Haemost.* 1991a Jan;65(1):46-51.
- España F, Gilabert J, Aznar J, Estellés A, Kobayashi T, Griffin J. Complexes of activated protein C with alpha 1-antitrypsin in normal pregnancy and in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1991b May;164(5 Pt 1):1310-6.
- España F, Gilabert J, Estellés A, Romeu A, Aznar J, Cabo A. Functionally active protein C inhibitor/plasminogen activator inhibitor-3 (PCI/PAI-3) is secreted in seminal vesicles, occurs at high concentrations in human seminal plasma and complexes with prostate-specific antigen. *Thromb Res.* 1991c Nov;64(3):309-20.
- España F, Gruber A, Heeb M, Hanson S, Harker L, Griffin J. In vivo and in vitro complexes of activated protein C with two inhibitors in baboons. *Blood.* 1991d Apr;77(8):1754-60.
- España F, Gilabert J, Vicente V, Estellés A, Vazquez L, Hendl S, et al. Activated protein C: alpha 1-antitrypsin (APC: alpha 1 AT) complex as a marker for in vitro diagnosis of prethrombotic states. *Thromb Res.* 1992 Jun;66(5):499-508.
- España F, Estellés A, Fernández P, Gilabert J, Sánchez-Cuenca J, Griffin JH. Evidence for the regulation of urokinase and tissue type plasminogen activators by the serpin, protein C inhibitor, in semen and blood plasma. *Thromb Haemost.* 1993 Dec;70(6):989-94.
- España F, Zuazu I, Vicente V, Estelles A, Marco P, Aznar J. Quantification of circulating activated protein C in human plasma by immunoassays--enzyme levels are proportional to total protein C levels. *Thromb Haemost.* 1996 Jan;75(1):56-61.

- España F, Villa P, Mira Y, Grancha S, Royo M, Estellés A, et al. Factor V Leiden and antibodies against phospholipids and protein S in a young woman with recurrent thromboses and abortion. *Haematologica*. 1999 Jan;84(1):80-4.
- España F, Vaya A, Mira Y, Medina P, Estelles A, Villa P, et al. Low level of circulating activated protein C is a risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost*. 2001 Dec;86(6):1368-73.
- España F, Medina P, Navarro S, Estelles A, Aznar J. Inherited abnormalities in the protein C activation pathway. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002a Sep-Dec;32(5-6):241-4.
- España F, Zorio E, Medina P, Osa A, Estellés A, Palencia M, et al. Low levels of circulating activated protein C are a risk factor for myocardial infarction. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002b;32 (Suppl 2):61.
- España F, Deguchi H, Medina P, Navarro S, Vayá A, Estellés A, Villa P, Mira Y, Lee YM, Ferrando F, Aznar J, Griffin JH. Efecto sinérgico entre deficiencias plasmáticas de proteína C activada y de glucosilceramida para el tromboembolismo venoso. *Haematologica*. 2003; 88 (Suplemento 7): 31.
- España F, Medina P, Navarro S, Estellés A, Aznar J. El sistema multifuncional de la proteína C. *Haematologica*. 2004 October;89 (Suppl 1):20-5.
- España F, Medina P, Navarro S, Zorio E, Estellés A, Aznar J. The multifunctional protein C system. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005 Apr;3(2):119-31.
- España F, Navarro S, Medina P, Zorio E, Estellés A. The role of protein C inhibitor in human reproduction. *Semin Thromb Hemost*. 2007 Feb;33(1):41-5.
- Espinosa G, Cervera A, Font J, Ingelmo M. [Aortic aneurysm and multiple venous thrombosis as initial manifestation of Behçet's disease]. *Rev Clin Esp*. 1999 Nov;199(11):775.
- Espinosa G, Cervera R, Reverter J, Tàssies D, Font J, Ingelmo M. Vascular involvement in Behçet's disease. *Isr Med Assoc J*. 2002a Aug;4(8):614-6.
- Espinosa G, Font J, Tàssies D, Vidaller A, Deulofeu R, López-Soto A, et al. Vascular involvement in Behçet's disease: relation with thrombophilic factors, coagulation activation, and thrombomodulin. *Am J Med*. 2002b Jan;112(1):37-43.
- Espinosa G, Font J. Behçet disease. *Med Clin (Barc)*. 2006 Oct;127(13):494-5.
- Estellés A, Garcia-Plaza I, Dasí A, Aznar J, Duart M, Sanz G, et al. Severe inherited "homozygous" protein C deficiency in a newborn infant. *Thromb Haemost*. 1984 Aug;52(1):53-6.
- Estellés A, Tormo G, Aznar J, España F, Tormo V. Reduced fibrinolytic activity in coronary heart disease in basal conditions and after exercise. *Thromb Res*. 1985 Nov;40(3):373-83.

Estellés A, Aznar J, Tormo G, Sapena P, Tormo V, España F. Influence of a rehabilitation sports programme on the fibrinolytic activity of patients after myocardial infarction. *Thromb Res.* 1989 Jul;55(2):203-12.

Estellés A, Gilabert J, Andrés C, España F, Aznar J. Plasminogen activator inhibitors type 1 and type 2 and plasminogen activators in amniotic fluid during pregnancy. *Thromb Haemost.* 1990 Oct;64(2):281-5.

Estellés A, Gilabert J, España F, Aznar J, Galbis M. Fibrinolytic parameters in normotensive pregnancy with intrauterine fetal growth retardation and in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1991 Jul;165(1):138-42.

Estellés A, Grancha S, Gilabert J, Thinnes T, Chirivella M, España F, et al. Abnormal expression of plasminogen activator inhibitors in patients with gestational trophoblastic disease. *Am J Pathol.* 1996 Oct;149(4):1229-39.

Estellés A, Gilabert J, Grancha S, Yamamoto K, Thinnes T, España F, et al. Abnormal expression of type 1 plasminogen activator inhibitor and tissue factor in severe preeclampsia. *Thromb Haemost.* 1998 Mar;79(3):500-8.

Estellés A, Cano A, Falcó C, España F, Gilabert J, Grancha S, et al. Lipoprotein(a) levels and isoforms and fibrinolytic activity in postmenopause--influence of hormone replacement therapy. *Thromb Haemost.* 1999 Jan;81(1):104-10.

Estellés A, Dalmau J, Falcó C, Berbel O, Castelló R, España F, et al. Plasma PAI-1 levels in obese children--effect of weight loss and influence of PAI-1 promoter 4G/5G genotype. *Thromb Haemost.* 2001 Aug;86(2):647-52.

Faioni E, Franchi F, Castaman G, Biguzzi E, Rodeghiero F. Mutations in the thrombomodulin gene are rare in patients with severe thrombophilia. *Br J Haematol.* 2002 Aug;118(2):595-9.

Falcó C, Estellés A, Dalmau J, España F, Aznar J. Influence of lipoprotein (a) levels and isoforms on fibrinolytic activity--study in families with high lipoprotein (a) levels. *Thromb Haemost.* 1998 Apr;79(4):818-23.

Falcó C, Tormo G, Estellés A, España F, Tormo E, Gilabert J, et al. Fibrinolysis and lipoprotein(a) in women with coronary artery disease. Influence of hormone replacement therapy. *Haematologica.* 2001 Jan;86(1):92-8.

Fay PJ, Smudzin TM, Walker FJ. Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa. Identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. *J Biol Chem.* 1991 Oct 25;266(30):20139-45.

Feistritzer C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood.* 2005 Apr;105(8):3178-84.

- Feistritzer C, Mosheimer B, Sturn D, Riewald M, Patsch J, Wiedermann C. Endothelial protein C receptor-dependent inhibition of migration of human lymphocytes by protein C involves epidermal growth factor receptor. *J Immunol*. 2006a Jan;176(2):1019-25.
- Feistritzer C, Schuepbach R, Mosnier L, Bush L, Di Cera E, Griffin J, et al. Protective signaling by activated protein C is mechanistically linked to protein C activation on endothelial cells. *J Biol Chem*. 2006b Jul;281(29):20077-84.
- Fernández J, Estellés A, Gilabert J, España F, Aznar J. Functional and immunologic protein S in normal pregnant women and in full-term newborns. *Thromb Haemost*. 1989 Jun;61(3):474-8.
- Ferrer-Antunes C. Polymorphisms of coagulation factor genes--a review. *Clin Chem Lab Med*. 1998 Dec;36(12):897-906.
- Filippova G, Fagerlie S, Klenova E, Myers C, Dehner Y, Goodwin G, et al. An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol*. 1996 Jun;16(6):2802-13.
- Finigan J, Dudek S, Singleton P, Chiang E, Jacobson J, Camp S, et al. Activated protein C mediates novel lung endothelial barrier enhancement: role of sphingosine 1-phosphate receptor transactivation. *J Biol Chem*. 2005 Apr;280(17):17286-93.
- Folsom A, Rosamond W, Shahar E, Cooper L, Aleksic N, Nieto F, et al. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Circulation*. 1999 Aug;100(7):736-42.
- Franco RF, Reitsma PH. Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet*. 2001 Oct;109(4):369-84.
- Frezzato M, Tosetto A, Rodeghiero F. Validated questionnaire for the identification of previous personal or familial venous thromboembolism. *Am J Epidemiol*. 1996 Jun;143(12):1257-65.
- Fukudome K, Esmon C. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem*. 1994 Oct;269(42):26486-91.
- Fuller M, Rozaklis T, Lovejoy M, Zarrinkalam K, Hopwood J, Meikle P. Glucosylceramide accumulation is not confined to the lysosome in fibroblasts from patients with Gaucher disease. *Mol Genet Metab*. 2008 Apr;93(4):437-43.
- Furuya S, Mitoma J, Makino A, Hirabayashi Y. Ceramide and its interconvertible metabolite sphingosine function as indispensable lipid factors involved in survival and dendritic differentiation of cerebellar Purkinje cells. *J Neurochem*. 1998 Jul;71(1):366-77.

Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro J. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med*. 1992 Jan;326(4):242-50.

Futerman AH, Boldin SA, Brann AB, Pelled D, Meivar-Levy I, Zisling R. Regulation of sphingolipid and glycosphingolipid metabolism during neuronal growth and development. *Biochem Soc Trans*. 1999 Aug;27(4):432-7.

Gandrille S, Vidaud D, Emmerich J, Clauser E, Sié P, Fiessinger J, et al. Molecular basis for hereditary antithrombin III quantitative deficiencies: a stop codon in exon IIIa and a frameshift in exon VI. *Br J Haematol*. 1991 Jul;78(3):414-20.

Gandrille S, Vidaud M, Aiach M, Alhenc-Gelas M, Fischer A, Gouault-Heilman M, et al. Two novel mutations responsible for hereditary type I protein C deficiency: characterization by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat*. 1992;1(6):491-500.

Gandrille S, Alhenc-Gelas M, Gaussem P, Aillaud M, Dupuy E, Juhan-Vague I, et al. Five novel mutations located in exons III and IX of the protein C gene in patients presenting with defective protein C anticoagulant activity. *Blood*. 1993a Jul;82(1):159-68.

Gandrille S, Jude B, Alhenc-Gelas M, Millaire A, Aiach M. Compound heterozygosity in a family with protein C deficiency illustrating the complexity of the underlying molecular mechanism. *Thromb Haemost*. 1993b Nov;70(5):747-52.

Gandrille S, Jude B, Alhenc-Gelas M, Emmerich J, Aiach M. First de novo mutations in the protein C gene of two patients with type I deficiency: a missense mutation and a splice site deletion. *Blood*. 1994 Oct;84(8):2566-70.

Gandrille S, Greengard J, Alhenc-Gelas M, Juhan-Vague I, Abgrall J, Jude B, et al. Incidence of activated protein C resistance caused by the ARG 506 GLN mutation in factor V in 113 unrelated symptomatic protein C-deficient patients. The French Network on the behalf of INSERM. *Blood*. 1995 Jul;86(1):219-24.

Gandrille S. Endothelial cell protein C receptor and the risk of venous thrombosis. *Haematologica*. 2008 Jun;93(6):812-6.

García-Moll X, Zouridakis E, Cole D, Kaski J. C-reactive protein in patients with chronic stable angina: differences in baseline serum concentration between women and men. *Eur Heart J*. 2000 Oct;21(19):1598-606.

Garner B, Priestman D, Stocker R, Harvey D, Butters T, Platt F. Increased glycosphingolipid levels in serum and aortae of apolipoprotein E gene knockout mice. *J Lipid Res*. 2002 Feb;43(2):205-14.

- Gaussem P, Gandrille S, Duchemin J, Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Aillaud M, et al. Influence of six mutations of the protein C gene on the Gla domain conformation and calcium affinity. *Thromb Haemost.* 1994 Jun;71(6):748-54.
- Geiger M, Huber K, Wojta J, Stingl L, Espana F, Griffin J, et al. Complex formation between urokinase and plasma protein C inhibitor in vitro and in vivo. *Blood.* 1989 Aug;74(2):722-8.
- Germain DP. [Gaucher disease: clinical, genetic and therapeutic aspects]. *Pathol Biol (Paris).* 2004 Jul;52(6):343-50.
- Ghosh S, Pendurthi U, Steinoe A, Esmon C, Rao L. Endothelial cell protein C receptor acts as a cellular receptor for factor VIIa on endothelium. *J Biol Chem.* 2007 Apr;282(16):11849-57.
- Gilabert J, Fernández J, España F, Aznar J, Estellés A. Physiological coagulation inhibitors (protein S, protein C and antithrombin III) in severe preeclamptic states and in users of oral contraceptives. *Thromb Res.* 1988 Feb;49(3):319-29.
- Gilabert J, Estellés A, Ridocci F, España F, Aznar J, Galbis M. Clinical and haemostatic parameters in the HELLP syndrome: relevance of plasminogen activator inhibitors. *Gynecol Obstet Invest.* 1990;30(2):81-6.
- Gilabert J, Estellés A, Ayuso M, España F, Chirivella M, Grancha S, et al. Evaluation of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in plasma and amniotic fluid in pregnancies complicated with intrauterine fetal growth retardation. *Gynecol Obstet Invest.* 1994;38(3):157-62.
- Gilabert-Estellés J, Ramon L, España F, Gilabert J, Castello R, Estelles A. Expression of the fibrinolytic components in endometriosis. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2006;35(1-2):136-40.
- Girolami A, Scarano L, Saggiorato G, Girolami B, Bertomoro A, Marchiori A. Congenital deficiencies and abnormalities of prothrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1998 Oct;9(7):557-69.
- Glaser C, Morser J, Clarke J, Blasko E, McLean K, Kuhn I, et al. Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity. A potential rapid mechanism for modulation of coagulation. *J Clin Invest.* 1992 Dec;90(6):2565-73.
- Glavac D, Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat.* 1993;2(5):404-14.
- Gomi K, Zushi M, Honda G, Kawahara S, Matsuzaki O, Kanabayashi T, et al. Antithrombotic effect of recombinant human thrombomodulin on thrombin-induced thromboembolism in mice. *Blood.* 1990 Apr;75(7):1396-9.
- Gönül M, Gül U, Kiliç C, Cakmak S, Soyulu S, Kiliç A. Homocysteine levels in patients with Behçet's disease and patients with recurrent aphthous stomatitis. *Clin Rheumatol.* 2009 Oct;28(10):1153-6.

- González-Escribano M, Morales J, García-Lozano J, Castillo M, Sánchez-Román J, Núñez-Roldán A, et al. TAP polymorphism in patients with Behçet's disease. *Ann Rheum Dis*. 1995 May;54(5):386-8.
- González-Gay M, García-Porrúa C, Brañas F, López-Lázaro L, Olivieri I. Epidemiologic and clinical aspects of Behçet's disease in a defined area of Northwestern Spain, 1988-1997. *J Rheumatol*. 2000 Mar;27(3):703-7.
- Graña J, Sánchez-Meizoso M, Galdo F. Epidemiological aspects of Behçet's disease in Galicia. *J Rheumatol*. 2001 Nov;28(11):2565-6.
- Grancha S, Estellés A, Gilabert J, Chirivella M, España F, Aznar J. Decreased expression of PAI-2 mRNA and protein in pregnancies complicated with intrauterine fetal growth retardation. *Thromb Haemost*. 1996 Nov;76(5):761-7.
- Grancha S, Estellés A, Tormo G, Falcó C, Gilabert J, España F, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promoter 4G/5G genotype and increased PAI-1 circulating levels in postmenopausal women with coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 1999 Apr;81(4):516-21.
- Grazide S, Terrisse A, Lerouge S, Laurent G, Jaffrézou J. Cytoprotective effect of glucosylceramide synthase inhibition against daunorubicin-induced apoptosis in human leukemic cell lines. *J Biol Chem*. 2004 Apr;279(18):18256-61.
- Grey S, Tsuchida A, Hau H, Orthner C, Salem H, Hancock W. Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN-gamma, or phorbol ester. *J Immunol*. 1994 Oct;153(8):3664-72.
- Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest*. 1981 Nov;68(5):1370-3.
- Griffin JH, Kojima K, Banka C, Curtiss L, Fernández J. High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *J Clin Invest*. 1999 Jan;103(2):219-27.
- Griffin JH, Deguchi H, Fernández J. Causes of thrombophilia yet to be discovered: a personal view. *Haemostasis*. 2000;30 Suppl 2:26-33.
- Griffin JH, Fernández JA, Deguchi H. Plasma lipoproteins, hemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost*. 2001 Jul;86(1):386-94.
- Griffin JH, Fernández J, Gale A, Mosnier L. Activated protein C. *J Thromb Haemost*. 2007 Jul;5 Suppl 1:73-80.
- Grinnell B, Walls J, Gerlitz B. Glycosylation of human protein C affects its secretion, processing, functional activities, and activation by thrombin. *J Biol Chem*. 1991 May;266(15):9778-85.

- Grinnell B, Gerlitz B, Berg D. Identification of a region in protein C involved in thrombomodulin-stimulated activation by thrombin: potential repulsion at anion-binding site I in thrombin. *Biochem J.* 1994 Nov;303 (Pt 3):929-33.
- Grinnell B, Berg D. Surface thrombomodulin modulates thrombin receptor responses on vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1996 Feb;270(2 Pt 2):H603-9.
- Grinnell B, Yan S. Novel antithrombotics based on modulation of the protein C pathway. *Coron Artery Dis.* 1998;9(2-3):89-97.
- Grinnell B, Joyce D. Recombinant human activated protein C: a system modulator of vascular function for treatment of severe sepsis. *Crit Care Med.* 2001 Jul;29(7 Suppl):S53-60; discussion S-1.
- Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet.* 1993 Oct;5(2):111-7.
- Gruber A, Griffin J. Direct detection of activated protein C in blood from human subjects. *Blood.* 1992 May;79(9):2340-8.
- Guerhazi S, Hamza M, Dellagi K. Protein S deficiency and antibodies to protein S in patients with Behçet's disease. *Thromb Res.* 1997 May;86(3):197-204.
- Gül A, Ozbek U, Oztürk C, Inanç M, Koniçe M, Özçelik T. Coagulation factor V gene mutation increases the risk of venous thrombosis in behçet's disease. *Br J Rheumatol.* 1996 Nov;35(11):1178-80.
- Gül A, Aslantas A, Tekinay T, Koniçe M, Özçelik T. Procoagulant mutations and venous thrombosis in Behçet's disease. *Rheumatology (Oxford).* 1999 Dec;38(12):1298-9.
- Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, Insalaco R, Fernández J, et al. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron.* 2004 Feb;41(4):563-72.
- Gürbüz O, Ozdemir Y, Coşar C, Kural G. Lipoprotein (a) in Behçet's disease as an indicator of disease activity and in thrombotic complications. *Eur J Ophthalmol.* 11(1):62-5.
- Gürgey A, Gurler A, Oner A, Mesci L, Kirazli S. Thrombomodulin levels in Behçet's disease with and without the factor V Leiden mutation. *Clin Rheumatol.* 1998;17(3):186-8.
- Guyton J, Klemp K. Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Jan;16(1):4-11.
- H**akomori S. Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem.* 1990 Nov 5;265(31):18713-6.

- Hancock W, Tsuchida A, Hau H, Thomson N, Salem H. The anticoagulants protein C and protein S display potent antiinflammatory and immunosuppressive effects relevant to transplant biology and therapy. *Transplant Proc.* 1992 Oct;24(5):2302-3.
- Hanly A, Winter D. The role of thrombomodulin in malignancy. *Semin Thromb Hemost.* 2007 Oct;33(7):673-9.
- Hasegawa N, Kandra T, Husari A, Veiss S, Hart W, Hedgpeth J, et al. The effects of recombinant human thrombomodulin on endotoxin-induced multiple-system organ failure in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Jun;153(6 Pt 1):1831-7.
- Hayashi T, Nakamura H, Okada A, Takebayashi S, Wakita T, Yuasa H, et al. Organization and chromosomal localization of the human endothelial protein C receptor gene. *Gene.* 1999 Oct;238(2):367-73.
- Haznedaroğlu I, Ozcebe O, Ozdemir O, Celik I, Dünder S, Kirazli S. Impaired haemostatic kinetics and endothelial function in Behçet's disease. *J Intern Med.* 1996a Oct;240(4):181-7.
- Haznedaroğlu I, Ozcebe O, Celik I, Dünder S, Kirazli S. Haemostatic markers of procoagulant imbalance in Behçet's disease. *Eur J Haematol.* 1996b Jul;57(1):107-8.
- Haznedaroğlu I, Ozdemir O, Ozcebe O, Dünder S, Kirazli S. Circulating thrombomodulin as a clue of endothelial damage in Behçet's disease. *Thromb Haemost.* 1996c Jun;75(6):974-5.
- Healy A, Hancock W, Christie P, Rayburn H, Rosenberg R. Intravascular coagulation activation in a murine model of thrombomodulin deficiency: effects of lesion size, age, and hypoxia on fibrin deposition. *Blood.* 1998 Dec;92(11):4188-97.
- Heeb M, España F, Geiger M, Collen D, Stump D, Griffin J. Immunological identity of heparin-dependent plasma and urinary protein C inhibitor and plasminogen activator inhibitor-3. *J Biol Chem.* 1987 Nov;262(33):15813-6.
- Heeb M, España F, Griffin J. Inhibition and complexation of activated protein C by two major inhibitors in plasma. *Blood.* 1989 Feb;73(2):446-54.
- Heeb M, España F. alpha2-macroglobulin and C1-inactivator are plasma inhibitors of human glandular kallikrein. *Blood Cells Mol Dis.* 1998 Dec;24(4):412-9.
- Hein L, Duplock S, Hopwood J, Fuller M. Lipid composition of microdomains is altered in a cell model of Gaucher disease. *J Lipid Res.* 2008 Aug;49(8):1725-34.
- Heit J, Petterson T, Owen W, Burke J, DE Andrade M, Melton Lr. Thrombomodulin gene polymorphisms or haplotypes as potential risk factors for venous thromboembolism: a population-based case-control study. *J Thromb Haemost.* 2005a Apr;3(4):710-7.

Heit J, Sobell J, Li H, Sommer S. The incidence of venous thromboembolism among Factor V Leiden carriers: a community-based cohort study. *J Thromb Haemost.* 2005b Feb;3(2):305-11.

Hirabayashi Y, Furuya S. [Sphingolipid biology in the central nervous system]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 1997 Oct;42(13):2027-38.

Hooper W, Phillips D, Renshaw M, Evatt B, Benson J. The up-regulation of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells by activated protein C. *J Immunol.* 1998 Sep;161(5):2567-73.

Hooper W, Phillips D, Renshaw M. Activated protein C induction of MCP-1 in human endothelial cells: a possible role for endothelial cell nitric oxide synthase. *Thromb Res.* 2001 Aug;103(3):209-19.

Hotchkiss R, Nicholson D. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2006 Nov;6(11):813-22.

Hubbard A, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med.* 2000 May;28(9):1379-86.

Hull R, Harris E, Gharavi A, Tincani A, Asherson R, Valesini G, et al. Anticardiolipin antibodies: occurrence in Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 1984 Oct;43(5):746-8.

Ichikawa S, Sakiyama H, Suzuki G, Hidari KI, Hirabayashi Y. Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 29;93(22):12654.

Ichikawa S, Ozawa K, Hirabayashi Y. Assignment of a UDP-glucose:ceramide glucosyltransferase gene (UGCG) to human chromosome band 9q31 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1997;79(3-4):233-4.

Ichikawa S, Hirabayashi Y. Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* 1998a May;8(5):198-202.

Ichikawa S, Osuka S, Hirabayashi Y. [Solving riddles of glycosphingolipids: analyses of sphingolipid functions by a glucosylceramide synthase-deficient mutant]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 1998b Dec;43(16 Suppl):2281-7.

Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dec;85(24):9436-40.

Ireland H, Kunz G, Kyriakoulis K, Stubbs PJ, Lane DA. Thrombomodulin gene mutations associated with myocardial infarction. *Circulation.* 1997 Jul 1;96(1):15-8.

- Ireland H, Konstantoulas C, Cooper J, Hawe E, Humphries S, Mather H, et al. EPCR Ser219Gly: elevated sEPCR, prothrombin F1+2, risk for coronary heart disease, and increased sEPCR shedding in vitro. *Atherosclerosis*. 2005 Dec;183(2):283-92.
- Isermann B, Hendrickson S, Zogg M, Wing M, Cummiskey M, Kisanuki Y, et al. Endothelium-specific loss of murine thrombomodulin disrupts the protein C anticoagulant pathway and causes juvenile-onset thrombosis. *J Clin Invest*. 2001 Aug;108(4):537-46.
- Isermann B, Sood R, Pawlinski R, Zogg M, Kalloway S, Degen J, et al. The thrombomodulin-protein C system is essential for the maintenance of pregnancy. *Nat Med*. 2003 Mar;9(3):331-7.
- Isermann B, Vinnikov I, Madhusudhan T, Herzog S, Kashif M, Blautzik J, et al. Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nat Med*. 2007 Nov;13(11):1349-58.
- Ishibashi S. Lipoprotein(a) and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Jan;21(1):1-2.
- Iwaki T, Cruz D, Martin J, Castellino F. A cardioprotective role for the endothelial protein C receptor in lipopolysaccharide-induced endotoxemia in the mouse. *Blood*. 2005 Mar;105(6):2364-71.
- Izquierdo M. Técnicas bioquímicas básicas para el análisis genético a nivel molecular. *Ingeniería Genética*. Madrid: Ediciones Pirámide S.A., 1993:62-7.
- J**ackman R, Beeler D, Fritze L, Soff G, Rosenberg R. Human thrombomodulin gene is intron depleted: nucleic acid sequences of the cDNA and gene predict protein structure and suggest sites of regulatory control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Sep;84(18):6425-9.
- Jackson C, Whitmont K, Tritton S, March L, Sambrook P, Xue M. New therapeutic applications for the anticoagulant, activated protein C. *Expert Opin Biol Ther*. 2008 Aug;8(8):1109-22.
- Jennemann R, Sandhoff R, Langbein L, Kaden S, Rothermel U, Gallala H, et al. Integrity and barrier function of the epidermis critically depend on glucosylceramide synthesis. *J Biol Chem*. 2007 Feb;282(5):3083-94.
- Jimbo M, Yamagishi K, Yamaki T, Nunomura K, Kabayama K, Igarashi Y, et al. Development of a new inhibitor of glucosylceramide synthase. *J Biochem*. 2000 Mar;127(3):485-91.
- Jin W, Inoue O, Tamura N, Suzuki-Inoue K, Satoh K, Berndt M, et al. A role for glycosphingolipid-enriched microdomains in platelet glycoprotein Ib-mediated platelet activation. *J Thromb Haemost*. 2007 May;5(5):1034-40.

Johansson L, Jansson J, Boman K, Nilsson T, Stegmayr B, Hallmans G. Prospective study on soluble thrombomodulin and von Willebrand factor and the risk of ischemic and hemorrhagic stroke. *Thromb Haemost.* 2002 Feb;87(2):211-7.

Jorquera J, Montoro J, Fernández M, Aznar J, Aznar J. Modified test for activated protein C resistance. *Lancet.* 1994 Oct;344(8930):1162-3.

Joyce D, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell B. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem.* 2001 Apr;276(14):11199-203.

Joyce D, Grinnell B. Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med.* 2002 May;30(5 Suppl):S288-93.

Kageyama R, Merlino G, Pastan I. A transcription factor active on the epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988a Jul;85(14):5016-20.

Kageyama R, Merlino G, Pastan I. Epidermal growth factor (EGF) receptor gene transcription. Requirement for Sp1 and an EGF receptor-specific factor. *J Biol Chem.* 1988b May;263(13):6329-36.

Kageyama R, Merlino G, Pastan I. Nuclear factor ETF specifically stimulates transcription from promoters without a TATA box. *J Biol Chem.* 1989 Sep;264(26):15508-14.

Kaklamani V, Vaiopoulos G, Kaklamani P. Behçet's Disease. *Semin Arthritis Rheum.* 1998 Feb;27(4):197-217.

Kannel W, Dawber T, Kagan A, Revotskie N, Stokes Jr. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1961 Jul;55:33-50.

Kerschen E, Fernandez J, Cooley B, Yang X, Sood R, Mosnier L, et al. Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *J Exp Med.* 2007 Oct;204(10):2439-48.

Kiraz S, Ertenli I, Oztürk M, Haznedaroğlu I, Celik I, Calgüneri M. Pathological haemostasis and "prothrombotic state" in Behçet's disease. *Thromb Res.* 2002 Jan;105(2):125-33.

Kisiel W. Human plasma protein C: isolation, characterization, and mechanism of activation by alpha-thrombin. *J Clin Invest.* 1979 Sep;64(3):761-9.

Knowles J, Wang H, Itakura H, Southwick A, Myers R, Iribarren C, et al. Association of polymorphisms in platelet and hemostasis system genes with acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 2007 Dec;154(6):1052-8.

Koç Y, Güllü I, Akpek G, Akpolat T, Kansu E, Kiraz S, et al. Vascular involvement in Behçet's disease. *J Rheumatol.* 1992 Mar;19(3):402-10.

- Komori H, Ichikawa S, Hirabayashi Y, Ito M. Regulation of UDP-glucose:ceramide glucosyltransferase-1 by ceramide. *FEBS Lett.* 2000 Jun 23;475(3):247-50.
- Kontogiannis V, Powell R. Behçet's disease. *Postgrad Med J.* 2000 Oct;76(900):629-37.
- Korkmaz C, Bozan B, Kosar M, Sahin F, Gülbas Z. Is there an association of plasma homocysteine levels with vascular involvement in patients with Behçet's syndrome? *Clin Exp Rheumatol.*20(4 Suppl 26):S30-4.
- Kubisz P, Stasko J, Holly P, Ivanková J, Pullmann R. More on: thrombomodulin gene polymorphisms or haplotypes as potential risk factors for venous thromboembolism: a population-based case-control study. *J Thromb Haemost.* 2005 Dec;3(12):2825-7.
- Kuhn L, Griffin J, Fisher C, Greengard J, Bouma B, España F, et al. Elucidating the structural chemistry of glycosaminoglycan recognition by protein C inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Nov;87(21):8506-10.
- Kumada T, Dittman W, Majerus P. A role for thrombomodulin in the pathogenesis of thrombin-induced thromboembolism in mice. *Blood.* 1988 Mar;71(3):728-33.
- Kunz G, Ohlin A, Adami A, Zöller B, Svensson P, Lane D. Naturally occurring mutations in the thrombomodulin gene leading to impaired expression and function. *Blood.* 2002 May;99(10):3646-53.
- Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Hidari N, Esmon CT. Identification of functional endothelial protein C receptor in human plasma. *J Clin Invest.* 1997 Jul 15;100(2):411-8.
- Kurosawa S, Stearns-Kurosawa D, Carson C, D'Angelo A, Della Valle P, Esmon C. Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. *Blood.* 1998 Jan;91(2):725-7.
- Kurosawa S, Esmon C, Stearns-Kurosawa D. The soluble endothelial protein C receptor binds to activated neutrophils: involvement of proteinase-3 and CD11b/CD18. *J Immunol.* 2000 Oct;165(8):4697-703.
- L**ane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, et al. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost.* 1996a Nov;76(5):651-62.
- Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, et al. Inherited thrombophilia: Part 2. *Thromb Haemost.* 1996b Dec;76(6):824-34.

- Laszik Z, Zhou X, Ferrell G, Silva F, Esmon C. Down-regulation of endothelial expression of endothelial cell protein C receptor and thrombomodulin in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol.* 2001 Sep;159(3):797-802.
- Le Cam-Duchez V, Gandrille S, Trégouët D, Alhenc-Gelas M, Emmerich J, Fiessinger J, et al. Influence of three potential genetic risk factors for thrombosis in 43 families carrying the factor V Arg 506 to Gln mutation. *Br J Haematol.* 1999 Sep;106(4):889-97.
- Le Flem L, Picard V, Emmerich J, Gandrille S, Fiessinger J, Aiach M, et al. Mutations in promoter region of thrombomodulin and venous thromboembolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Apr;19(4):1098-104.
- Le Flem L, Mennen L, Aubry M, Aiach M, Scarabin P, Emmerich J, et al. Thrombomodulin promoter mutations, venous thrombosis, and varicose veins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Mar;21(3):445-51.
- Lee L, Abe A, Shayman J. Improved inhibitors of glucosylceramide synthase. *J Biol Chem.* 1999 May;274(21):14662-9.
- Lee Y, Kang S, Yang J, Choi Y, Sheen D, Lee E, et al. Coagulation parameters and plasma total homocysteine levels in Behçet's disease. *Thromb Res.* 2002 Apr;106(1):19-24.
- Leiba M, Sidi Y, Gur H, Leiba A, Ehrenfeld M. Behçet's disease and thrombophilia. *Ann Rheum Dis.* 2001 Dec;60(12):1081-5.
- Leiba M, Seligsohn U, Sidi Y, Harats D, Sela B, Griffin J, et al. Thrombophilic factors are not the leading cause of thrombosis in Behçet's disease. *Ann Rheum Dis.* 2004 Nov;63(11):1445-9.
- Lenk N, Ozet G, Alli N, Coban O, Erbaşı S. Protein C and protein S activities in Behçet's disease as risk factors of thrombosis. *Int J Dermatol.* 1998 Feb;37(2):124-5.
- Li Y, Chen J, Wu H, Shi G, Huang H, Chao T, et al. G-33A mutation in the promoter region of thrombomodulin gene and its association with coronary artery disease and plasma soluble thrombomodulin levels. *Am J Cardiol.* 2000 Jan;85(1):8-12.
- Li Y, Chen C, Yeh P, Lin H, Chang B, Lin J, et al. Functional mutation in the promoter region of thrombomodulin gene in relation to carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2001 Feb;154(3):713-9.
- Li Y, Chen J, Tsai W, Chao T, Guo H, Tsai L, et al. Synergistic effect of thrombomodulin promoter -33G/A polymorphism and smoking on the onset of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2002 Jan;87(1):86-91.
- Libby P, Ridker P. Novel inflammatory markers of coronary risk: theory versus practice. *Circulation.* 1999 Sep;100(11):1148-50.

- Lie J. Vascular involvement in Behçet's disease: arterial and venous and vessels of all sizes. *J Rheumatol*. 1992 Mar;19(3):341-3.
- Liu D, Cheng T, Guo H, Fernández J, Griffin J, Song X, et al. Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat Med*. 2004 Dec;10(12):1379-83.
- López-Sagaseta J, Montes R, Puy C, Díez N, Fukudome K, Hermida J. Binding of factor VIIa to the endothelial cell protein C receptor reduces its coagulant activity. *J Thromb Haemost*. 2007 Sep;5(9):1817-24.
- Ludeman M, Kataoka H, Srinivasan Y, Esmon N, Esmon C, Coughlin S. PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin. *J Biol Chem*. 2005 Apr;280(13):13122-8.
- Lupu C, Goodwin C, Westmuckett A, Emeis J, Scully M, Kakkar V, et al. Tissue factor pathway inhibitor in endothelial cells colocalizes with glycolipid microdomains/caveolae. Regulatory mechanism(s) of the anticoagulant properties of the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Nov;17(11):2964-74.
- M**ader R, Ziv M, Adawi M, Lavi I. Thrombophilic factors and their relation to thromboembolic and other clinical manifestations in Behçet's disease. *J Rheumatol*. 1999 Nov;26(11):2404-8.
- Mammo L, Al-Dalaan A, Bahabri S, Saour J. Association of factor V Leiden with Behçet's disease. *J Rheumatol*. 1997 Nov;24(11):2196-8.
- Mann KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost*. 1999 Aug;82(2):165-74.
- Mann KG. Thrombin formation. *Chest*. 2003a Sep;124(3 Suppl):4S-10S.
- Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost*. 2003b Jul;1(7):1504-14.
- Mannucci PM, Vigano S. Deficiencies of protein C, an inhibitor of blood coagulation. *Lancet*. 1982 Aug 28;2(8296):463-7.
- Mannucci PM, Tripodi A. Mechanisms, markers and management of hypercoagulable states. *Haemostasis*. 1996 Oct;26 (Suppl 4):1-8.
- Marlar RA. Protein C in thromboembolic disease. *Semin Thromb Hemost*. 1985 Oct;11(4):387-93.
- Martinelli I, Taioli E, Bucciarelli P, Akhavan S, Mannucci PM. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Mar;19(3):700-3.
- Martinelli I. Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb Haemost*. 2001 Jul;86(1):395-403.

- Martínez M, Ricart J, Ruiz-Aja S, Rus A, Todolí J, Calvo J, et al. Platelet activation and red blood cell phosphatidylserine exposure evaluated by flow cytometry in patients with Behçet's disease: are they related to thrombotic events? *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2007;36(1):18-22.
- Martínez-Sales V, Vila V, Ferrando M, Reganon E. Atorvastatin neutralizes the up-regulation of thrombospondin-1 induced by thrombin in human umbilical vein endothelial cells. *Endothelium*.14(4-5):233-8.
- Maruyama I. Biology of endothelium. *Lupus*. 1998;7 Suppl 2:S41-3.
- Matsuda M, Sugo T, Sakata Y, Murayama H, Mimuro J, Tanabe S, et al. A thrombotic state due to an abnormal protein C. *N Engl J Med*. 1988 Nov 10;319(19):1265-8.
- Mattjus P, Malewicz B, Valiyaveetil J, Baumann W, Bittman R, Brown R. Sphingomyelin modulates the transbilayer distribution of galactosylceramide in phospholipid membranes. *J Biol Chem*. 2002 May;277(22):19476-81.
- Medina P, Navarro S, Estelles A, Vaya A, Woodhams B, Mira Y, et al. Contribution of polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene to soluble endothelial protein C receptor and circulating activated protein C levels, and thrombotic risk. *Thromb Haemost*. 2004 May;91(5):905-11.
- Medina P, Navarro S, Estelles A, Vaya A, Bertina RM, Espana F. Influence of the 4600A/G and 4678G/C polymorphisms in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene on the risk of venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden. *Thromb Haemost*. 2005 Aug;94(2):389-94.
- Medina P, Navarro S, Estellés A, España F. Polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene and thrombophilia. *Thromb Haemost*. 2007 Sep;98(3):564-9.
- Medina P, Navarro S, Corral J, Zorio E, Roldán V, Estellés A, et al. Endothelial protein C receptor polymorphisms and risk of myocardial infarction. *Haematologica*. 2008 Sep;93(9):1358-63.
- Meivar-Levy I, Futerman AH. Up-regulation of neutral glycosphingolipid synthesis upon long term inhibition of ceramide synthesis by fumonisin B1. *J Biol Chem*. 1999 Feb 19;274(8):4607-12.
- Meyer M, Kutscher G, Vogel G. Simultaneous genotyping for factor V Leiden and prothrombin G20210A variant by a multiplex PCR-SSCP assay on whole blood. *Thromb Haemost*. 1999 Jan;81(1):162-3.
- Mezzano D, España F, Panes O, Medina P, Pais E, Marshall G, et al. Increased activation of protein C, but lower plasma levels of free, activated protein C in uraemic patients: relationship with systemic inflammation and haemostatic activation. *Br J Haematol*. 2001 Jun;113(4):905-10.

- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
- Mineo C, Deguchi H, Griffin J, Shaul P. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res.* 2006 Jun;98(11):1352-64.
- Mira Y, Todolí T, Alonso R, Micó T, Vayá A, Ferrando F, et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A in relation to arterial and/or vein rethrombosis: two cases. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2001 Jul;7(3):234-7.
- Misgav M, Goldberg Y, Zeltser D, Eldor A, Berliner A. Fatal pulmonary artery thrombosis in a patient with Behçet's disease, activated protein C resistance and hyperhomocystinemia. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2000 Jul;11(5):421-3.
- Mohri M, Gonda Y, Oka M, Aoki Y, Gomi K, Kiyota T, et al. The antithrombotic effects of recombinant human soluble thrombomodulin (rhsTM) on tissue factor-induced disseminated intravascular coagulation in crab-eating monkeys (*Macaca fascicularis*). *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1997a Jul;8(5):274-83.
- Mohri M, Sata M, Gomi K, Maruyama Y, Osame M, Maruyama I. Abnormalities in the protein C anticoagulant pathway detected by a novel assay using human thrombomodulin. *Lupus.* 1997b;6(7):590-6.
- Mohri M, Sata M, Gomi K, Maruyama Y, Osame M, Maruyama I. [A novel assay for detecting the thrombomodulin-protein C/S anticoagulant pathway using human thrombomodulin (prothrombinase assay)]. *Rinsho Byori.* 1997c Feb;Suppl 104:203-4.
- Mohri M, Suzuki M, Sugimoto E, Sata M, Yamamoto S, Maruyama I. Effects of recombinant human soluble thrombomodulin (rhs-TM) on clot-induced coagulation in human plasma. *Thromb Haemost.* 1998 Dec;80(6):925-9.
- Molina E, Hermida J, López-Sagaseta J, Puy C, Montes R. The functional properties of a truncated form of endothelial cell protein C receptor generated by alternative splicing. *Haematologica.* 2008 Jun;93(6):878-84.
- Moll C, Bogas M, Gomez-Puerta JA, Celis R, Vazquez I, Rodriguez F, et al. Macroscopic features of knee synovitis in early untreated Behcet disease and psoriatic arthritis. *Clin Rheumatol.* 2009 Jun 9.
- Montes R, Hurtado V, Alonso A, Foco L, Zonzin P, Mannucci P, et al. Autoantibodies against the endothelial receptor of protein C are associated with acute myocardial infarction in young women. *J Thromb Haemost.* 2005 Jul;3(7):1454-8.
- Moore K, Andreoli S, Esmon N, Esmon C, Bang N. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest.* 1987 Jan;79(1):124-30.
- Moore D, Kaneski C, Askari H, Schiffmann R. The cerebral vasculopathy of Fabry disease. *J Neurol Sci.* 2007 Jun;257(1-2):258-63.

- Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost.* 2001 Jul;86(1):66-74.
- Mosnier L, Gale A, Yegneswaran S, Griffin JH. Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity. *Blood.* 2004 Sep;104(6):1740-4.
- Mosnier L, Yang X, Griffin JH. Activated protein C mutant with minimal anticoagulant activity, normal cytoprotective activity, and preservation of thrombin activable fibrinolysis inhibitor-dependent cytoprotective functions. *J Biol Chem.* 2007a Nov;282(45):33022-33.
- Mosnier L, Zlokovic B, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood.* 2007b Apr;109(8):3161-72.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
- Müthing J, Schweppe C, Karch H, Friedrich A. Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thromb Haemost.* 2009 Feb;101(2):252-64.
- Myles T, Nishimura T, Yun T, Nagashima M, Morser J, Patterson A, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, a potential regulator of vascular inflammation. *J Biol Chem.* 2003 Dec;278(51):51059-67.
- Nakabayashi M, Yamamoto S, Suzuki K. Analysis of thrombomodulin gene polymorphism in women with severe early-onset preeclampsia. *Semin Thromb Hemost.* 1999;25(5):473-9.
- Nakazawa F, Koyama T, Saito T, Shibakura M, Yoshinaga H, Chung D, et al. Thrombomodulin with the Asp468Tyr mutation is expressed on the cell surface with normal cofactor activity for protein C activation. *Br J Haematol.* 1999 Aug;106(2):416-20.
- Nalçacı M, Pekçelen Y. Antithrombin III, protein C and protein S plasma levels in patients with Behçet's disease. *J Int Med Res.* 26(4):206-8.
- Navarro S, Ricart J, Medina P, Vayá A, Villa P, Todolí J, et al. Activated protein C levels in Behçet's disease and risk of venous thrombosis. *Br J Haematol.* 2004 Aug;126(4):550-6.
- Navarro-López F. [Genes and coronary heart disease]. *Rev Esp Cardiol.* 2002 Apr;55(4):413-31.
- Nawa K, Ono M, Fujiwara H, Sugiyama N, Uchiyama T, Marumoto Y. Monoclonal antibodies against human thrombomodulin whose epitope is located in epidermal growth factor-like domains. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Apr;1205(2):162-70.

- Nguyen M, Arkell J, Jackson C. Activated protein C directly activates human endothelial gelatinase A. *J Biol Chem*. 2000 Mar;275(13):9095-8.
- Nickerson D. Seattle SNPs. NHLBI Program for Genomic Applications. Seattle, Wa: UW-FHCRC, 2003.
- Nishimura T, Myles T, Piliposky A, Piliposky A, Kao P, Berry G, et al. Thrombin-activatable procarboxypeptidase B regulates activated complement C5a in vivo. *Blood*. 2007 Mar;109(5):1992-7.
- Norlund L, Holm J, Zöller B, Ohlin A. A common thrombomodulin amino acid dimorphism is associated with myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 1997a Feb;77(2):248-51.
- Norlund L, Zöller B, Ohlin A. A novel thrombomodulin gene mutation in a patient suffering from sagittal sinus thrombosis. *Thromb Haemost*. 1997b Oct;78(4):1164-6.
- Norlund L, Holm J, Zöller B, Ohlin A. The Ala25-Thr mutation in the thrombomodulin gene is not frequent in Swedish patients suffering from ischemic heart disease. *Thromb Haemost*. 1999 Oct;82(4):1367-8.
- O'Brien L, Gupta A, Grinnell B. Activated protein C and sepsis. *Front Biosci*. 2006;11:676-98.
- O'Brien L, Richardson M, Mehrbod S, Berg D, Gerlitz B, Gupta A, et al. Activated protein C decreases tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand by an EPCR- independent mechanism involving Egr-1/Erk-1/2 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Dec;27(12):2634-41.
- Obrig T, Seaner R, Bentz M, Lingwood C, Boyd B, Smith A, et al. Induction by sphingomyelinase of shiga toxin receptor and shiga toxin 2 sensitivity in human microvascular endothelial cells. *Infect Immun*. 2003 Feb;71(2):845-9.
- Oganesyan V, Oganesyan N, Terzyan S, Qu D, Dauter Z, Esmon N, et al. The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid. *J Biol Chem*. 2002 Jul;277(28):24851-4.
- Öhlin A, Marlar R. The first mutation identified in the thrombomodulin gene in a 45-year-old man presenting with thromboembolic disease. *Blood*. 1995 Jan;85(2):330-6.
- Öhlin A, Norlund L, Marlar R. Thrombomodulin gene variations and thromboembolic disease. *Thromb Haemost*. 1997 Jul;78(1):396-400.
- Öhlin A, Holm J, Hillarp A. Genetic variation in the human thrombomodulin promoter locus and prognosis after acute coronary syndrome. *Thromb Res*. 2004;113(5):319-26.

Oku H, Wongtangtharn S, Iwasaki H, Inafuku M, Shimatani M, Toda T. Tumor specific cytotoxicity of glucosylceramide. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007 Nov;60(6):767-75.

Olivot J, Labreuche J, De Broucker T, Poirier O, Cambien F, Aiach M, et al. Thrombomodulin gene polymorphisms in brain infarction and mortality after stroke. *J Neurol*. 2008 Apr;255(4):514-9.

Oner A, Gürgey A, Gürler A, Mesci L. Factor V Leiden mutation in patients with Behçet's disease. *J Rheumatol*. 1998 Mar;25(3):496-8.

Orem A, Değer O, Cımşit G, Karahan S, Akyol N, Yildirmiş S. Plasma Lipoprotein(a) and its relationship with disease activity in patients with Behçet's disease. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1995a Aug;33(8):473-8.

Orem A, Değer O, Memiş O, Bahadır S, Ovalı E, Cımşit G. Lp(a) lipoprotein levels as a predictor of risk for thrombogenic events in patients with Behçet's disease. *Ann Rheum Dis*. 1995b Sep;54(9):726-9.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(8):2766-70.

Pagano R. Endocytic trafficking of glycosphingolipids in sphingolipid storage diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003 May;358(1433):885-91.

Park H, Nabika T, Jang Y, Kwon H, Cho S, Masuda J. Association of G-33A polymorphism in the thrombomodulin gene with myocardial infarction in Koreans. *Hypertens Res*. 2002 May;25(3):389-94.

Pecheniuk N, Elias D, Xu X, Griffin J. Failure to validate association of gene polymorphisms in EPCR, PAR-1, FSAP and protein S Tokushima with venous thromboembolism among Californians of European ancestry. *Thromb Haemost*. 2008 Feb;99(2):453-5.

Peiretti F, Canault M, Morange P, Alessi M, Nalbone G. [The two sides of ADAM17 in inflammation: implications in atherosclerosis and obesity]. *Med Sci (Paris)*. 2009 Jan;25(1):45-50.

Pereira C, Schaer D, Bachli E, Kurrer M, Schoedon G. Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Mar;28(3):504-10.

Perry R, Ridgway N. Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jun;1734(3):220-34.

Petersen T. The amino-terminal domain of thrombomodulin and pancreatic stone protein are homologous with lectins. *FEBS Lett*. 1988 Apr;231(1):51-3.

Pipitone N, Boiardi L, Olivieri I, Cantini F, Salvi F, Malatesta R, et al. Clinical manifestations of Behçet's disease in 137 Italian patients: results of a multicenter study. *Clin Exp Rheumatol*. 2004;22(6 Suppl 36):S46-51.

Poort S, Rosendaal F, Reitsma P, Bertina R. 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 Nov;88(10):3698-703.

Poredos P. Possibilities for clinical use of prostacyclin in vascular disease. *Pflugers Arch*. 2000;440(5 Suppl):R137-8.

Preston R, Ajzner E, Razzari C, Karageorgi S, Dua S, Dahlbäck B, et al. Multifunctional specificity of the protein C/activated protein C Gla domain. *J Biol Chem*. 2006 Sep;281(39):28850-7.

Prosser J. Detecting single-base mutations. *Trends Biotechnol*. 1993 Jun;11(6):238-46.

Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. NCBI Reference Sequence project: update and current status. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jan 1;31(1):34-7.

Qu D, Wang Y, Song Y, Esmon N, Esmon C. The Ser219-->Gly dimorphism of the endothelial protein C receptor contributes to the higher soluble protein levels observed in individuals with the A3 haplotype. *J Thromb Haemost*. 2006 Jan;4(1):229-35.

Qu D, Wang Y, Esmon N, Esmon C. Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17. *J Thromb Haemost*. 2007 Feb;5(2):395-402.

Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res*. 1995 Dec 11;23(23):4878-84.

Rabinovich E, Shinar Y, Leiba M, Ehrenfeld M, Langevitz P, Livneh A. Common FMF alleles may predispose to development of Behçet's disease with increased risk for venous thrombosis. *Scand J Rheumatol*. 36(1):48-52.

Ramón L, Gilabert-Estellés J, Cosín R, Gilabert J, España F, Castelló R, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G polymorphism and endometriosis. Influence of PAI-1 polymorphism on PAI-1 antigen and mRNA expression. *Thromb Res*. 2008;122(6):854-60.

Rao AK, Sheth S, Kaplan R. Inherited hypercoagulable states. *Vasc Med*. 1997 Nov;2(4):313-20.

- Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica J, Fukudome K, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. Inhibition of activated protein C anticoagulant function without modulation of reaction with proteinase inhibitors. *J Biol Chem.* 1996 Jul 19;271(29):17499-503.
- Reny J, Alhenc-Gelas M, Fontana P, Bissery A, Julia P, Fiessinger J, et al. The factor II G20210A gene polymorphism, but not factor V Arg506Gln, is associated with peripheral arterial disease: results of a case-control study. *J Thromb Haemost.* 2004 Aug;2(8):1334-40.
- Rezaie A, Cooper S, Church F, Esmon C. Protein C inhibitor is a potent inhibitor of the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem.* 1995 Oct;270(43):25336-9.
- Ricart J, Vaya A, Todolí J, Calvo J, Contreras M, España F, et al. Haemorheological alterations in Behçet's disease are not related to a tendency for venous thrombosis. *Thromb Res.* 2005a;115(5):399-404.
- Ricart J, Vayá A, Todolí J, Santaolaria M, Calvo J, Aznar J. Erythrocyte aggregation in Behçet's disease determined with the Sefam and Myrenne aggregometer. Lack of association with thrombosis and uveitis. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005b;33(4):389-96.
- Ricart J, Todolí J, Vilata J, Calvo J, Román J, Santaolaria M, et al. [Behçet disease: study of 74 patients]. *Med Clin (Barc).* 2006a Oct;127(13):496-9.
- Ricart J, Vayá A, Santaolaria M, España F, Aznar J. Dyslipidaemia in Behçet's disease as a thrombotic risk factor. *Ann Rheum Dis.* 2006b Sep;65(9):1248-9.
- Ricart J, Vayá A, Todolí J, Calvo J, Villa P, Estellés A, et al. Thrombophilic risk factors and homocysteine levels in Behçet's disease in eastern Spain and their association with thrombotic events. *Thromb Haemost.* 2006c Apr;95(4):618-24.
- Ricart J, Ramón L, Vayá A, España F, Santaolaria M, Todolí J, et al. Fibrinolytic inhibitor levels and polymorphisms in Behçet disease and their association with thrombosis. *Br J Haematol.* 2008 May;141(5):716-9.
- Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Beverly RK, Psaty BM, Longstreth WT, Jr., et al. Factor V Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood.* 1997 Apr 15;89(8):2817-21.
- Rosendaal F, Doggen C, Zivelin A, Arruda V, Aiach M, Siscovick D, et al. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost.* 1998 Apr;79(4):706-8.
- Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet.* 1999 Apr 3;353(9159):1167-73.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993 Apr;362(6423):801-9.

Roychoudhury AK, Nei M. *Human Polymorphic Genes: World Distribution*. New York: Oxford Univ. Press, 1988.

Ruiz M, Marugan I, Estellés A, Navarro I, España F, Alberola V, et al. The influence of chemotherapy on plasma coagulation and fibrinolytic systems in lung cancer patients. *Cancer*. 1989 Feb;63(4):643-8.

Sage H. Characterization and modulation of extracellular glycoproteins secreted by endothelial cells in culture. In: Gimbrone MA, ed. *Vascular Endothelium in Hemostasis and Thrombosis*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1986:187-208.

Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G. Behçet's disease. *N Engl J Med*. 1999 Oct;341(17):1284-91.

Sala N. Assays for protein C and S. In: Aznar J, España F, eds. *Protein C pathway*. Barcelona: Springer-Verlag, 1991:93-110.

Salomaa V, Matei C, Aleksic N, Sansores-Garcia L, Folsom A, Juneja H, et al. Soluble thrombomodulin as a predictor of incident coronary heart disease and symptomless carotid artery atherosclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: a case-cohort study. *Lancet*. 1999a May;353(9166):1729-34.

Salomaa V, Wu K. Soluble thrombomodulin as predictor of incident coronary heart disease. *Lancet*. 1999b Nov;354(9190):1646-7.

Salomaa V, Matei C, Aleksic N, Sansores-García L, Folsom AR, Juneja H, Park E, Wu KK. Cross-sectional association of soluble thrombomodulin with mild peripheral artery disease; the ARIC study. *Atherosclerosis Risk in Communities. Atherosclerosis*. 2001 Aug;157(2):309-14.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *DNA Sequencing. Molecular Cloning, a laboratory manual*. second ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989a:13.3-.102.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Gel electrophoresis of DNA. Molecular Cloning, a laboratory manual*. second ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989b:6.3-6.60.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Preparation of reagents and buffers used in molecular cloning. Molecular Cloning, a laboratory manual*. second ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989c:B.20-B.6.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Quantitation of DNA and RNA. Molecular Cloning, a laboratory manual*. second ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989d:E.5-E.6.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Standard markers for gel electrophoresis. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. second ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989e:E.20.
- Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science*. 1981 Dec 11;214(4526):1205-10.
- Santamaria A, Mateo J, Oliver A, Menéndez B, Souto JC, Borrell M, et al. Risk of thrombosis associated with oral contraceptives of women from 97 families with inherited thrombophilia: high risk of thrombosis in carriers of the G20210A mutation of the prothrombin gene. *Haematologica*. 2001 Sep;86(9):965-71.
- Saposnik B, Reny J, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M, Gandrille S. A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood*. 2004 Feb;103(4):1311-8.
- Saposnik B, Lesteven E, Lokajczyk A, Esmon C, Aiach M, Gandrille S. Alternative mRNA is favored by the A3 haplotype of the EPCR gene PROCRA and generates a novel soluble form of EPCR in plasma. *Blood*. 2008 Apr;111(7):3442-51.
- Sarican T, Ayabakan H, Turkmen S, Kalaslioglu V, Baran F, Yenice N. Homocysteine: an activity marker in Behçet's disease? *J Dermatol Sci*. 2007 Feb;45(2):121-6.
- Sawkar A, Cheng W, Beutler E, Wong C, Balch W, Kelly J. Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov;99(24):15428-33.
- Sawkar A, Adamski-Werner S, Cheng W, Wong C, Beutler E, Zimmer K, et al. Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chem Biol*. 2005 Nov;12(11):1235-44.
- Sayinalp N, Ozcebe O, Ozdemir O, Haznedaroğlu I, Dündar S, Kirazli S. Cytokines in Behçet's disease. *J Rheumatol*. 1996 Feb;23(2):321-2.
- Schaffer AA, Aravind L, Madden TL, Shavirin S, Spouge JL, Wolf YI, et al. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jul 15;29(14):2994-3005.
- Schuepbach R, Feistritz C, Brass L, Riewald M. Activated protein C-cleaved protease activated receptor-1 is retained on the endothelial cell surface even in the presence of thrombin. *Blood*. 2008 Mar;111(5):2667-73.
- Schwartz B, España F. Two distinct urokinase-serpin interactions regulate the initiation of cell surface-associated plasminogen activation. *J Biol Chem*. 1999 May;274(21):15278-83.

- Seguí R, Estellés A, Mira Y, España F, Villa P, Falcó C, et al. PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects. *Br J Haematol*. 2000 Oct;111(1):122-8.
- Seigneur M, Dufourcq P, Conri C, Constans J, Mercié P, Pruvost A, et al. Levels of plasma thrombomodulin are increased in atheromatous arterial disease. *Thromb Res*. 1993a Sep;71(6):423-31.
- Seigneur M, Dufourcq P, Conri C, Constans J, Mercie P, Pruvost A, et al. Plasma thrombomodulin: new approach of endothelium damage. *Int Angiol*. 1993b Dec;12(4):355-9.
- Seigneur M, Dufourcq P, Belloc F, Lenoble M, Renard M, Boisseau M. Influence of pentoxifylline on membrane thrombomodulin levels in endothelial cells submitted to hypoxic conditions. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;25 Suppl 2:S85-7.
- Seligsohn U, Zivelin A. Thrombophilia as a multigenic disorder. *Thromb Haemost*. 1997 Jul;78(1):297-301.
- Sengül N, Demirer S, Yerdel M, Terzioğlu G, Akin B, Gürler A, et al. Comparison of coagulation parameters for healthy subjects and Behçet disease patients with and without vascular involvement. *World J Surg*. 2000 Dec;24(12):1584-8.
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jan 1;29(1):308-11.
- Shi C, Shi G, Chang Y, Han H, Kuo C, Liu C, et al. Evidence of human thrombomodulin domain as a novel angiogenic factor. *Circulation*. 2005 Apr;111(13):1627-36.
- Shibata M, Kumar SR, Amar A, Fernandez JA, Hofman F, Griffin JH, et al. Anti-inflammatory, antithrombotic, and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke. *Circulation*. 2001 Apr 3;103(13):1799-805.
- Sillence DJ, Puri V, Marks DL, Butters TD, Dwek RA, Pagano RE, et al. Glucosylceramide modulates membrane traffic along the endocytic pathway. *J Lipid Res*. 2002 Nov;43(11):1837-45.
- Sills RH, Marlar RA, Montgomery RR, Deshpande GN, Humbert JR. Severe homozygous protein C deficiency. *J Pediatr*. 1984 Sep;105(3):409-13.
- Simioni P. The molecular genetics of familial venous thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 1999 Sep;12(3):479-503.
- Simmonds R, Lane D. Structural and functional implications of the intron/exon organization of the human endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR) gene: comparison with the structure of CD1/major histocompatibility complex alpha1 and alpha2 domains. *Blood*. 1999 Jul;94(2):632-41.

- Simmonds RE, Hermida J, Rezende SM, Lane DA. Haemostatic genetic risk factors in arterial thrombosis. *Thromb Haemost.* 2001a Jul;86(1):374-85.
- Simmonds RE, Lane DA. The endothelial cell protein C receptor: a candidate genetic risk factor for thrombosis. *Thromb Haemost.* 2001b Oct;86(4):939-41.
- Simó M, Ricart J, Santaolaria M, Ortí G, Vayá A. Erythrocyte deformability does not seem to be altered in Behçet's disease. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2007;36(1):83-8.
- Smirnov M, Safa O, Esmon N, Esmon C. Inhibition of activated protein C anticoagulant activity by prothrombin. *Blood.* 1999 Dec;94(11):3839-46.
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986 Jun 12-18;321(6071):674-9.
- Solá E, Vayá A, Simó M, Hernández-Mijares A, Morillas C, España F, et al. Fibrinogen, plasma viscosity and blood viscosity in obesity. Relationship with insulin resistance. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2007;37(4):309-18.
- Solá E, Vayá A, España F, Castelló R, Ramón L, Hernández-Mijares A, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 levels in severe and morbid obesity. Effect of weight loss and influence of 4G/5G polymorphism. *Thromb Res.* 2008a;122(3):320-7.
- Solá E, Vayá A, Villa P, España F, Estellés A, García K, et al. Obesity and activated protein C resistance. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2008b;36(2):64-8.
- Solá E, Navarro S, Medina P, Vayá A, Estellés A, Hernández-Mijares A, et al. Activated protein C levels in obesity and weight loss influence. *Thromb Res.* 2009 Mar;123(5):697-700.
- Soria J, Navarro S, Medina P, Souto R, Buil A, Estellés A, et al. Heritability of plasma concentrations of activated protein C in a Spanish population. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2009 Jan;20(1):17-21.
- Spek CA, Reitsma PH. Genetic risk factors for venous thrombosis. *Mol Genet Metab.* 2000 Sep-Oct;71(1-2):51-61.
- Stearns-Kurosawa D, Burgin C, Parker D, Comp P, Kurosawa S. Bimodal distribution of soluble endothelial protein C receptor levels in healthy populations. *J Thromb Haemost.* 2003 Apr;1(4):855-6.
- Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 24;99(26):16899-903.
- Suzuki K, Stenflo J, Dahlbäck B, Teodorsson B. Inactivation of human coagulation factor V by activated protein C. *J Biol Chem.* 1983 Feb 10;258(3):1914-20.

Suzuki K, Hayashi T. Protein C and its inhibitor in malignancy. *Semin Thromb Hemost.* 2007 Oct;33(7):667-72.

Tabernero D, España F, Vicente V, Estellés A, Gilabert J, Aznar J. Protein C inhibitor and other components of the protein C pathway in patients with acute deep vein thrombosis during heparin treatment. *Thromb Haemost.* 1990 Jun;63(3):380-2.

Taylor FJ, Chang A, Esmon C, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick K. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboon. *J Clin Invest.* 1987 Mar;79(3):918-25.

Taylor FJ, Stearns-Kurosawa D, Kurosawa S, Ferrell G, Chang A, Laszik Z, et al. The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood.* 2000 Mar;95(5):1680-6.

Thude H, Wilkens A, Anders O, Barz D. Analysis of the thrombomodulin gene in patients with venous thrombosis. *Thromb Res.* 2002 Aug;107(3-4):109-14.

Tohda G, Oida K, Okada Y, Kosaka S, Okada E, Takahashi S, et al. Expression of thrombomodulin in atherosclerotic lesions and mitogenic activity of recombinant thrombomodulin in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Dec;18(12):1861-9.

Toydemir P, Elhan A, Tükün A, Toydemir R, Gürler A, Tüzüner A, et al. Effects of factor V gene G1691A, methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T, and prothombin gene G20210A mutations on deep venous thrombogenesis in Behçet's disease. *J Rheumatol.* 2000 Dec;27(12):2849-54.

Tracy R. Epidemiological evidence for inflammation in cardiovascular disease. *Thromb Haemost.* 1999 Aug;82(2):826-31.

Uchiba M, Okajima K, Oike Y, Ito Y, Fukudome K, Isobe H, et al. Activated protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circ Res.* 2004 Jul;95(1):34-41.

Uchida Y, Murata S, Schmuth M, Behne MJ, Lee JD, Ichikawa S, et al. Glucosylceramide synthesis and synthase expression protect against ceramide-induced stress. *J Lipid Res.* 2002 Aug;43(8):1293-302.

Uitte de Willige S, Van Marion V, Rosendaal F, Vos H, de Visser M, Bertina R. Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2004 Aug;2(8):1305-10.

Van de Wouwer M, Collen D, Conway E. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004a Aug;24(8):1374-83.

- Van de Wouwer M, Conway E. Novel functions of thrombomodulin in inflammation. *Crit Care Med.* 2004b May;32(5 Suppl):S254-61.
- van der Velden P, Krommenhoek-Van Es T, Allaart C, Bertina R, Reitsma P. A frequent thrombomodulin amino acid dimorphism is not associated with thrombophilia. *Thromb Haemost.* 1991 May;65(5):511-3.
- Varadi K, Rosing J, Tans G, Pabinger I, Keil B, Schwarz HP. Factor V enhances the cofactor function of protein S in the APC-mediated inactivation of factor VIII: influence of the factor VR506Q mutation. *Thromb Haemost.* 1996 Aug;76(2):208-14.
- Vasta G, Quesenberry M, Ahmed H, O'Leary N. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Dev Comp Immunol.* 23(4-5):401-20.
- Vayá A, Forner M, Estellés A, Villa P, Mira Y, Ferrando F, et al. Intracardiac thrombosis in a case of Behcet's disease associated with the prothrombin 20210G-A mutation. *Haematologica.* 2000a Apr;85(4):425-8.
- Vayá A, Llopis I, Trenor R, Mira Y, Estellés A, Aznar J. Spontaneous superficial vein thrombosis in a young patient double heterozygous for factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation: a case report. *Haematologica.* 2000b;85(E-letters):E11.
- Vayá A, Trenor R, Molla S, Estellés A, Mira Y, Villa P, et al. Acute myocardial infarction associated with the prothrombin G20210A mutation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2000c Apr;6(2):111-2.
- Vayá A, Mira Y, Ferrando F, Contreras M, Estelles A, Espana F, et al. Hyperlipidaemia and venous thromboembolism in patients lacking thrombophilic risk factors. *Br J Haematol.* 2002a Jul;118(1):255-9.
- Vayá A, Mira Y, Martínez M, Villa P, Ferrando F, Estellés A, Corella D, Aznar J. Biological risk factors for deep vein thrombosis. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2002b;26(1):41-53.
- Vayá A, Mira Y, Mateo J, Falco C, Villa P, Estelles A, Corella D, Fontcuberta J, Aznar J. Prothrombin G20210A mutation and oral contraceptive use increase upper-extremity deep vein thrombotic risk. *Thromb Haemost.* 2003 Mar;89(3):452-7.
- Vayá A, Ricart J, Todolí J, Micó L, Contreras T, Aznar J. Do hemorheological alterations play any role in the development of thrombotic events in Behçet's disease? *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004;30(3-4):411-4.
- Vicente V, España F, Taberero D, Estellés A, Aznar J, Hendl S, et al. Evidence of activation of the protein C pathway during acute vascular damage induced by Mediterranean spotted fever. *Blood.* 1991 Jul;78(2):416-22.

- Vidaud D, Emmerich J, Sirieix M, Sié P, Alhenc-Gelas M, Aiach M. Molecular basis for antithrombin III type I deficiency: three novel mutations located in exon IV. *Blood*. 1991 Nov;78(9):2305-9.
- Villa P, Estellés A, Pérez-Requejo J, España F, Aznar J. Possible homozygous factor VIII disorder associated with fibrinolytic hyperactivity. *Acta Haematol*. 1985;73(2):93-6.
- Villa P, Aznar J, Vaya A, España F, Ferrando F, Mira Y, et al. Hereditary homozygous heparin cofactor II deficiency and the risk of developing venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 1999 Sep;82(3):1011-4.
- Villa P, Iborra J, Serra J, Gilsanz A, Casaña P, Aznar J, et al. Evaluation of an automated method for the quantification of von Willebrand factor antigen. Its application in the study of vascular dysfunction. *Haematologica*. 2001 Nov;86(11):1180-5.
- Vostrov A, Quitschke W. The zinc finger protein CTCF binds to the APBbeta domain of the amyloid beta-protein precursor promoter. Evidence for a role in transcriptional activation. *J Biol Chem*. 1997 Dec;272(52):33353-9.
- W**alker FJ. Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. *J Biol Chem*. 1980 Jun 25;255(12):5521-4.
- Watanabe R, Wu K, Paul P, Marks DL, Kobayashi T, Pittelkow MR, et al. Up-regulation of glucosylceramide synthase expression and activity during human keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*. 1998 Apr 17;273(16):9651-5.
- Weiler H, Lindner V, Kerlin B, Isermann B, Hendrickson S, Cooley B, et al. Characterization of a mouse model for thrombomodulin deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Sep;21(9):1531-7.
- Weiler H, Isermann BH. Thrombomodulin. *J Thromb Haemost*. 2003 Jul;1(7):1515-24.
- Weiler-Guettler H, Christie P, Beeler D, Healy A, Hancock W, Rayburn H, et al. A targeted point mutation in thrombomodulin generates viable mice with a prethrombotic state. *J Clin Invest*. 1998 May;101(9):1983-91.
- Weinreb N, Andersson H, Banikazemi M, Barranger J, Beutler E, Charrow J, et al. Prevalence of type 1 Gaucher disease in the United States. *Arch Intern Med*. 2008 Feb;168(3):326-7; author reply 7-8.
- White B, Schmidt M, Murphy C, Livingstone W, O'Toole D, Lawler M, et al. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol*. 2000 Jul;110(1):130-4.

Wu K, Aleksic N, Ahn C, Boerwinkle E, Folsom A, Juneja H. Thrombomodulin Ala455Val polymorphism and risk of coronary heart disease. *Circulation*. 2001 Mar;103(10):1386-9.

Xu J, Qu D, Esmon N, Esmon C. Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem*. 2000 Feb;275(8):6038-44.

Xue M, Thompson P, Kelso I, Jackson C. Activated protein C stimulates proliferation, migration and wound closure, inhibits apoptosis and upregulates MMP-2 activity in cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res*. 2004 Sep;299(1):119-27.

Xue M, March L, Sambrook P, Jackson C. Differential regulation of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 by activated protein C: relevance to inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 Sep;56(9):2864-74.

Yamashita T, Wada R, Sasaki T, Deng C, Bierfreund U, Sandhoff K, et al. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):9142-7.

Yamashita T, Wada R, Proia RL. Early developmental expression of the gene encoding glucosylceramide synthase, the enzyme controlling the first committed step of glycosphingolipid synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Dec 19;1573(3):236-40.

Yamashita T, Allende M, Kalkofen D, Werth N, Sandhoff K, Proia R. Conditional LoxP-flanked glucosylceramide synthase allele controlling glycosphingolipid synthesis. *Genesis*. 2005 Dec;43(4):175-80.

Yazici H, Tüzün Y, Pazarli H, Yurdakul S, Ozyazgan Y, Ozdoğan H, et al. Influence of age of onset and patient's sex on the prevalence and severity of manifestations of Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 1984 Dec;43(6):783-9.

Yazici H, Kalayoglu S, Dalay N. A new method for the detection of bcr/abl sequences amplified by polymerase chain reaction (PCR) following bone marrow transplantation. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1998 Sep;101(3):297-306.

Ye J, Rezaie AR, Esmon CT. Glycosaminoglycan contributions to both protein C activation and thrombin inhibition involve a common arginine-rich site in thrombin that includes residues arginine 93, 97, and 101. *J Biol Chem*. 1994 Jul 8;269(27):17965-70.

Yegneswaran S, Deguchi H, Griffin JH. Glucosylceramide, a neutral glycosphingolipid anticoagulant cofactor, enhances the interaction of human- and bovine-activated protein C with negatively charged phospholipid vesicles. *J Biol Chem*. 2003 Apr 25;278(17):14614-21.

Yesilirmak D, Kumral A, Tugyan K, Cilaker S, Baskin H, Yilmaz O, et al. Effects of activated protein C on neonatal hypoxic ischemic brain injury. *Brain Res.* 2008 May;1210:56-62.

Yurdakul S, Hekim N, Soysal T, Fresko I, Bavunoglu I, Ozbakir F, et al. Fibrinolytic activity and d-dimer levels in Behçet's syndrome. *Clin Exp Rheumatol.*23(4 Suppl 38):S53-8.

Zheng X, Li W, Gu J, Qu D, Ferrell G, Esmon N, et al. Effects of membrane and soluble EPCR on the hemostatic balance and endotoxemia in mice. *Blood.* 2007 Feb;109(3):1003-9.

Zöller B, Norlund L, Leksell H, Nilsson J, von Schenck H, Rosén U, et al. High prevalence of the FVR506Q mutation causing APC resistance in a region of southern Sweden with a high incidence of venous thrombosis. *Thromb Res.* 1996 Sep;83(6):475-7.

Zöller B, García de Frutos P, Hillarp A, Dahlbäck B. Thrombophilia as a multigenic disease. *Haematologica.* 1999 Jan;84(1):59-70.

Zorio E, Castelló R, Falcó C, España F, Osa A, Almenar L, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in young patients with myocardial infarction and its relationship with the fibrinolytic function and the protein C system. *Br J Haematol.* 2003 Sep;122(6):958-65.

Zorio E, Falcó C, Arnau M, España F, Osa A, Ramón L, et al. Lipoprotein (a) in young individuals as a marker of the presence of ischemic heart disease and the severity of coronary lesions. *Haematologica.* 2006a Apr;91(4):562-5.

Zorio E, Navarro S, Medina P, Estellés A, Osa A, Rueda J, et al. Circulating activated protein C is reduced in young survivors of myocardial infarction and inversely correlates with the severity of coronary lesions. *J Thromb Haemost.* 2006b Jul;4(7):1530-6.

Zorio E, Gilabert-Estellés J, España F, Ramón L, Cosín R, Estellés A. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. *Curr Med Chem.* 2008;15(9):923-9.

8. – ANEXO

*“Todo esfuerzo tiene su recompensa,
Pero quedarse sólo en palabras lleva a la pobreza”
(Proverbios)*

A continuación se incluyen los artículos publicados y las contribuciones a congresos relacionados con la presente Tesis Doctoral.



Endothelial protein C receptor polymorphisms and risk of myocardial infarction

Pilar Medina,¹ Silvia Navarro,¹ Javier Corral,² Esther Zorio,³ Vanessa Roldán,² Amparo Estellés,¹ Amparo Santamaría,⁴ Francisco Marín,⁵ Joaquín Rueda,³ Rogier M. Bertina,⁶ and Francisco España¹ for the RECAVA Thrombosis Groups

¹Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain; ²Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, Murcia, Spain; ³Servicio de Cardiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain; ⁴Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ⁵Servicio de Cardiología, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain and ⁶Hemostasis and Thrombosis Research Centre, Department of Hematology, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands

ABSTRACT

Background

Haplotypes A1 and A3 in the endothelial protein C receptor gene are tagged by the 4678G/C and 4600A/G polymorphisms, respectively, and have been reported to influence the risk of venous thromboembolism. We assessed whether these haplotypes modify the risk of premature myocardial infarction.

Design and Methods

We genotyped these polymorphisms in 689 patients with premature myocardial infarction and 697 control subjects. Activated protein C and soluble endothelial protein C receptor levels were also measured.

Results

After adjustment for other cardiovascular risk factors, A1 and A3 haplotypes protected against premature myocardial infarction (odds ratio 0.7, 95% CI 0.4-0.8, $p=0.044$ and 0.5, 0.3-0.6, $p<0.001$, respectively). Moreover, the protective role of these haplotypes seemed to be additive, as carriers of both the A1 and A3 haplotypes had adjusted odds ratios of 0.3 (0.2-0.5, $p<0.001$) and 0.4 (0.2-0.8, $p=0.006$) compared to those carrying only the A1 or A3 haplotype, respectively. The presence of the A1 haplotype was associated with increased levels of activated protein C whereas individuals carrying the A3 haplotype showed the highest soluble endothelial protein C receptor levels.

Conclusions

These results show that A1 haplotype carriers have a reduced risk of premature myocardial infarction via the association of this haplotype with increased activated protein C plasma levels. The study also shows that carriers of the A3 haplotype have a reduced risk of myocardial infarction, only in part due to increased soluble endothelial protein C levels.

Key words: endothelial protein C receptor, haplotypes, premature myocardial infarction, activated protein C, soluble EPCR.

Citation: Medina P, Navarro S, Corral J, Zorio E, Roldán V, Estellés A, Santamaría A, Marín F, Rueda J, Bertina RM, and España F for the RECAVA Thrombosis Groups. Endothelial protein C receptor polymorphisms and risk of myocardial infarction. *Haematologica* 2008; 93:1358-1363. doi: 10.3324/haematol.13066

©2008 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Acknowledgments: we thank Úrsula Salinas and María Amparo Miranda for their excellent technical assistance.

Funding: this study was in part supported by funding from Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (FS P1050844, P1050799, P1070831, CP07/00326, Red RECAVA RDD6/0014/0004) and Fundación Mutua Madrileña, Spain.

Manuscript received March 14, 2008. Revised version arrived on April 25, 2008. Manuscript accepted May 23, 2008.

Correspondence: Francisco España, Hospital Universitario La Fe, Centro de Investigación, Av. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain. E-mail: espanya_fra@gva.es



Haplotypes of the *EPCR* gene, prothrombin levels, and the risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A mutation

Silvia Navarro,¹ Pilar Medina,¹ Yolanda Mira,² Amparo Estellés,¹ Piedad Villa,² Fernando Ferrando,² Amparo Vayá,² Rogier M. Bertina,³ and Francisco España¹

¹Research Center and ²Department of Clinical Pathology, La Fe University Hospital, Valencia, Spain; ³Hemostasis and Thrombosis Research Center, Department of Hematology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

Funding: this work was partially supported by Instituto de Salud Carlos III (PI050844, PI050799 and RETICS RECANA RD06/0014/0004) and Fundación Mutua Madrileña, Spain.

Manuscript received October 31, 2007. Revised version arrived on January 16, 2008. Manuscript accepted January 18, 2008.

Correspondence: Francisco España, Hospital Universitario La Fe, Centro de Investigación, Av. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain. E-mail: espanya_fra@gva.es

ABSTRACT

Background

Haplotypes A1 and A3 in the endothelial protein C receptor (*EPCR*) gene are tagged by 4678G/C and 4600A/G respectively. We assessed whether these haplotypes modify the risk of venous thromboembolism in carriers of the prothrombin 20210A allele.

Design and Methods

We genotyped 4678G/C and 4600A/G in 246 20210A carriers: 84 venous thromboembolism probands and 162 relatives (13 symptomatic), and in 140 relatives not carrying the 20210A variant. Prothrombin and soluble *EPCR* (s*EPCR*) levels were also measured.

Results

Among probands, the mean age at first onset was lower in carriers (35±8 years) than non-carriers of the 4600G allele (44±14 years) ($p=0.004$). The probability of being free of thrombosis at age 40 was lower in 20210A carriers with the *EPCR* 4600G allele ($p=0.015$). The frequency of the 4600G allele ($p=0.002$) and the levels of prothrombin antigen ($p=0.002$) and s*EPCR* ($p<0.001$) were higher in the probands than in their asymptomatic relatives. Multivariate analyses showed that the presence of the 4600G allele (OR=2.5, 95% confidence interval 1.3-5.0), s*EPCR* >147 ng/mL (2.8, 1.5-5.2) and prothrombin >129% (3.8, 1.8-8.3) all increased the thrombotic risk. In bivariate analysis, including the 4600G allele and s*EPCR*>147 ng/mL, only the latter remained associated with risk.

Conclusions

These results show that in 20210A carriers the venous thromboembolism risk is influenced both by the actual prothrombin levels and by the *EPCR* A3 haplotype, via its effect on s*EPCR* levels.

Key words: endothelial protein C receptor, prothrombin G20210A mutation, venous thromboembolism, prothrombin level, activated protein C.

Citation: Navarro S, Medina P, Mira Y, Estellés A, Villa P, Ferrando F, Vayá A, Bertina RM, and España F. Haplotypes of the *EPCR* gene, prothrombin levels, and the risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A mutation. *Haematologica* 2008 June; 93(6):885-891. doi: 10.3324/haematol.12448

©2008 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Theme Issue Article

Polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene and thrombophilia

Pilar Medina, Silvia Navarro, Amparo Estellés, Francisco España
Research Center, La Fe University Hospital, Valencia, Spain

Summary

The protein C anticoagulant pathway plays a crucial role as a regulator of the blood clotting cascade. Protein C is activated on the vascular endothelial cell membrane by the thrombin-thrombomodulin complex. Once formed, activated protein C (APC) down-regulates thrombin formation by inactivating factors (F)Va and FVIIIa. Endothelial protein C receptor (EPCR) is able to bind protein C and increase the rate of protein C activation.

Normal APC generation depends on the precise assemblage, on the surface of endothelial cells, of thrombin, thrombomodulin, protein C and EPCR. Therefore, any change in the efficiency of this assemblage may cause reduced/increased APC generation and modify the risk of thrombosis. This review highlights the different mutations/polymorphisms reported in the *EPCR* gene and their association with the risk of thrombosis.

Keywords

Coagulation inhibitors, deep vein thrombosis, inherited coagulation disorders, polymorphisms, protein C/S pathway

Thromb Haemost 2007; 98: 564–569

Introduction

The protein C anticoagulant pathway plays a crucial role in the regulation of fibrin formation. Protein C is a vitamin K-dependent plasma glycoprotein that circulates as an inactive form (1). Thrombin activates protein C by cleavage at the N-terminus. This activation is slow and requires the presence of the transmembrane glycoprotein, thrombomodulin (TM). The thrombin-TM complex efficiently activates protein C to activated protein C (APC) (2). APC, with its cofactor protein S, down-regulates thrombin formation via proteolytic degradation of the procoagulant cofactors factor Va and VIIIa (3, 4). *In vivo*, APC is regulated by two major plasma inhibitors, protein C inhibitor and α_1 -antitrypsin (5–7).

Another endothelial cell-specific protein, which is involved in the activation of protein C anticoagulant pathway, is the endothelial cell protein C receptor (EPCR). EPCR is a type I transmembrane protein, which is highly expressed on the endothelium of large vessels while it is present at trace levels in most capillary beds (8). It binds protein C on the endothelial cell surface with high affinity and enhances the rate of protein C activation

(9). The γ -carboxyglutamic acid domain of protein C is critical for the interaction between protein C and EPCR and the efficient activation of protein C (10). Once activated, APC may dissociate from EPCR, bind to protein S and exhibit its anticoagulant functions, or may remain bound to EPCR and display antiinflammatory, antiapoptotic and cytoprotective functions.

The clinical relevance of protein C activation by the thrombin-TM-EPCR complex is evident from reports showing a clear association between deficiencies of protein C (11–13) and protein S (14–16) or reduced APC levels (17, 18) and thrombosis.

As indicated above, normal APC generation depends on the precise assemblage, on the surface of vascular endothelial cells, of at least four proteins: thrombin, TM, protein C and EPCR. Alterations in this assembly may cause reduced/increased APC generation and modify the risk of thrombosis. In the last years, several reports have suggested the association between mutations/polymorphisms in the *EPCR* gene and venous and arterial thrombosis. This review will focus on the several mutations/polymorphisms reported in the *EPCR* gene and their association with the risk of thrombosis.

Correspondence to:
Francisco España
Hospital La Fe, Centro de Investigación
Avda. Campanar, 21
46009 Valencia, Spain
Tel.: +34 963862797, Fax: +34 961973018
E-mail: espanya_fra@gva.es

Financial support:
This study was supported in part by research grants from Fundación Mutua Madrileña, from Generalitat Valenciana (ACOMP06/024) and from Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) e Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (PI050799, PI050844 and Red RECAVA RD06/0014/0004), Madrid, Spain.

Received January 31, 2007
Accepted after resubmission May 25, 2007

Prepublished online August 18, 2007
doi:10.1160/TH07-01-0071

ORIGINAL ARTICLE

Circulating activated protein C is reduced in young survivors of myocardial infarction and inversely correlates with the severity of coronary lesions¹

E. ZORIO,^{*2} S. NAVARRO,^{†2} P. MEDINA,[†] A. ESTELLÉS,[†] A. OSA,^{*} J. RUEDA,^{*} P. CUBILLO,[‡] J. AZNAR[‡] and F. ESPAÑA[†]

^{*}Department of Cardiology, [†]Research Center, and [‡]Department of Clinical Pathology, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

To cite this article: Zorio E, Navarro S, Medina P, Estellés A, Osa A, Rueda J, Cubillo P, Aznar J, España F. Circulating activated protein C is reduced in young survivors of myocardial infarction and inversely correlates with the severity of coronary lesions. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1530–6.

Summary. *Background:* Cardiovascular risk factors for myocardial infarction (MI) are less frequent in younger than in older MI survivors. Therefore, the thrombotic component of MI may play a more important role at a young age. As activated protein C (APC) provides systemic anticoagulant and anti-inflammatory protection, a low plasma APC level may be an arterial thrombotic risk factor. *Aim:* To determine whether there is an association between reduced APC levels and early MI and severe coronary lesions. *Methods:* APC was measured in 231 young MI survivors and 231 controls. *Results:* Low APC levels were significantly associated with MI. Compared with the fourth quartile, the odds ratio (OR) for APC values in the first quartile was 3.7 [95% confidence interval (CI) = 2.1–6.4], and 3.2 (1.5–7.0) after adjustment for cardiovascular risk factors. Moreover, each decrease of 0.43 ng mL⁻¹ (1 SD) in APC increased the OR 1.7 times (1.4–2.2), and 1.5 times (1.2–1.9) after adjustment for cardiovascular risk factors. Low APC levels were also associated with the number of coronary arteries affected and with the severity of coronary lesions ($P < 0.001$). *Conclusions:* There is a significant association between low circulating APC levels and both early MI and the extent and severity of coronary atherosclerosis, which might be related to the anticoagulant and anti-inflammatory properties of APC.

Keywords: activated protein C, inflammation, myocardial infarction, risk factors, stenosis score.

Correspondence: Francisco España, Hospital Universitario La Fe, Centro de Investigación, Av. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain. Tel.: +34 96 3862797; fax: 34 96 1973018; e-mail: espanya_fra@gva.es

¹This study was approved by the Ethics Committee. Informed consent was obtained from all participants.

²These authors contributed equally to this study.

Received 9 March 2006, accepted 6 April 2006

Introduction

Classical cardiovascular risk factors are common in individuals who develop myocardial infarction (MI). However, their presence does not always trigger an arterial thrombotic event, suggesting that several additional factors might be involved. Particularly, young individuals who develop MI often have fewer cardiovascular risk factors and atherosclerotic burden than older patients [1]. Thus, alterations in the hemostatic components of MI may play a more important role in young people.

Protein C is a natural anticoagulant that circulates in plasma as a zymogen and is converted into the active enzyme, activated protein C (APC), on the surface of endothelial cells following the assembly of at least four proteins: thrombin, thrombomodulin, protein C and endothelial protein C receptor (EPCR) [2]. The protein C anticoagulant pathway plays a crucial role as a regulator of thrombosis [3,4]. Thus, isolated deficiencies of protein C and protein S and the presence of factor V Leiden account for more than 50% of the cases of familial thrombophilia [5] and a low APC level may be an independent risk factor for venous thromboembolism [6]. Although the involvement of the protein C pathway in the pathogenesis of arterial thrombosis is not completely understood, several lines of evidence suggest that protein C may also play a protective role against arterial thrombotic events. Indeed, blockage of protein C activation worsened the myocardial injury in a porcine heart model [7], the presence of an autoantibody that blocked the thrombin-thrombomodulin activation of protein C was associated with recurrent spontaneous arterial thrombosis [8], and extensive venous and arterial thrombosis associated with an inhibitor to APC has been reported [9]. In a population-based survey of 826 individuals, an independent and gradual association was found between a low response to APC and both atherosclerosis and arterial disease [10]. Hereditary protein C deficiency may contribute to an early onset of MI [11,12]. Finally, several reports have suggested an association between mutations in the thrombomodulin and EPCR genes and arterial thrombosis [13,14]. Although the majority of these abnormalities should

© 2006 International Society on Thrombosis and Haemostasis

Blood Coagulation, Fibrinolysis and Cellular Haemostasis

Influence of the 4600A/G and 4678G/C polymorphisms in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene on the risk of venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden

Pilar Medina¹, Silvia Navarro¹, Amparo Estellés¹, Amparo Vayá², Rogier M. Bertina³, Francisco España¹

¹Research Center and ²Department of Clinical Pathology, La Fe University Hospital, Valencia, Spain

³Hemostasis and Thrombosis Research Centre, Department of Hematology, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands

Summary

Two polymorphisms in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene, 4600A/G and 4678G/C, have been reported to influence the risk of venous thromboembolism (VTE). The objective of this study was to assess whether these polymorphisms modify the risk of VTE in carriers of factor V (FV) Leiden. We genotyped 295 carriers of FV Leiden for these polymorphisms: 100 unrelated patients with a history of VTE (propositi) and 195 relatives (14 of them symptomatic) of 81 of the propositi. Spontaneous VTE events occurred in 71% of propositi carrying the 4678GG genotype, 65% carrying the GC, and 43% with the CC genotype. The mean age at the first onset was significantly higher in propositi carrying the 4678CC than in those with the GC or GG genotype ($p=0.046$). Among the 276 carriers of FV Leiden from the 81 families studied, the 95 symptomatic members had similar 4600G allele and 4600AG genotype frequencies but sig-

nificantly lower 4678C allele ($p=0.002$) and 4678CC genotype ($p=0.004$) frequencies than the 181 asymptomatic members. The probability of being free of thrombosis at age 40 was significantly higher in the 66 carriers of the 4678CC genotype (94%) than in the 138 carrying the GC (72%) or in the 72 with the 4678GG genotype (60%) ($p<0.001$). Multivariate analysis showed that the 4678CC genotype reduced the risk of thrombosis in carriers of FV Leiden (OR=0.31; 95% CI=0.16–0.83). The incidence of VTE was higher in the 195 relatives with FV Leiden than in the 133 without FV Leiden (OR=4.7; CI=1.3–7.2). These results show that carriers of FV Leiden with the 4678CC genotype have a significantly reduced risk of VTE compared with those carrying the 4678GG or GC genotype, probably due to the higher APC levels previously observed in individuals carrying the 4678CC genotype.

Keywords

Endothelial protein C receptor, factor V Leiden, venous thromboembolism, polymorphisms, survival time, interaction

Thromb Haemost 2005; 94: 389–94

Introduction

The protein C anticoagulant pathway plays a crucial role in the control of thrombus formation (1). Protein C circulates in plasma as a zymogen that is converted to the active enzyme, activated protein C (APC), on the surface of endothelial cells by the thrombin-thrombomodulin complex. Another receptor, the endothelial cell protein C receptor (EPCR), binds protein C on the endothelial cell surface and further enhances the rate of protein C activation (2). APC degrades the procoagulant cofactors factor Va and VIIIa, two factors necessary for the amplification of throm-

bin formation and thus regulating fibrin formation (1). Congenital resistance to APC (3) due to a single point mutation, a G-to-A transition at nucleotide position 1691 in the factor V gene, which predicts the synthesis of an abnormal factor V molecule (FV Leiden) (4), is the most common genetic risk factor for familial venous thrombosis (4–6). It is present in 3–6% of Caucasians and in 15–50% of patients with venous thromboembolism (VTE) (4, 7). Its clinical expression shows a wide intra- and inter-familial variation, which may be explained by the concomitant presence of FV Leiden with other risk factors (8). In fact, VTE is a multicausal disorder. Both genetic and acquired factors

Correspondence to:
Francisco España, Ph.D.
Hospital La Fe
Centro de Investigación
Avda. Campanar, 21
46009 Valencia, Spain
Tel.: 34-963862797; Fax: 34-961973018
E-mail: espanys_fra@eva.es

Received February 4, 2005
Accepted after resubmission May 19, 2005

Financial support:
This work was partially supported by research grants from Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, PI020125 and PI020136), from Fundación Mutua Madrileña, and from Generalitat Valenciana-Consejería de Empresa, Universidad y Ciencia (Grupo03/010), Spain. S. Navarro was the recipient of a fellowship from Fundación Española de Trombosis y Hemostasia (FETH), Spain

Prepublished online July 13, 2005 DOI: 10.1160/TH05-02-0085

The Multifunctional Protein C System

F. España*, P. Medina, S. Navarro, E. Zorio, A. Estellés and J. Aznar

Research Center and Department of Clinical Pathology, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

Abstract: The protein C pathway is a major regulator of blood coagulation, since it controls the conversion of prothrombin to thrombin through a feedback inhibition mechanism. Protein C circulates in plasma as an inactive zymogen and is activated on the surface of endothelial cells by the thrombin-thrombomodulin complex, a process that can be further enhanced when protein C binds to its membrane receptor, the endothelial-cell protein C receptor. Activated protein C (APC) is then released from the complex, binds protein S and inhibits thrombin formation by inactivating coagulation factors Va and VIIIa. The importance of the protein C anticoagulant pathway is emphasized by the increased risk of venous thromboembolism (VTE) associated with protein C and protein S deficiencies, the factor V Leiden mutation, and reduced circulating APC levels. The protein C pathway also plays a significant role in inflammatory processes, since it prevents the lethal effects of *E. coli*-associated sepsis in animal models and improves the outcome of patients with severe sepsis. APC seems to display anti-apoptotic and neuroprotective activities. Thus, it reduces organ damage in animal models of sepsis, ischemic injury, endothelial cell injury, or stroke. Further research will hopefully widen the current therapeutic perspectives in all these illnesses, where these effects might play a crucial role in their treatment. This review will summarize the mechanisms that contribute to these biological activities of the protein C pathway.

Key Words: Protein C, activated protein C, thrombomodulin, endothelial protein C receptor, venous thromboembolism, inflammation, apoptosis, neuroprotection.

INTRODUCTION

Activated protein C (APC) is the active, anticoagulant enzyme formed upon activation of the protein C zymogen by the thrombin-thrombomodulin (TM) complex on the surface of endothelial cells, platelets and monocytes. The endothelial protein C receptor (EPCR) binds protein C and further increases the rate of protein C activation by the thrombin-TM complex. Once formed, APC may dissociate from EPCR, bind to its cofactor, protein S, and proteolytically inactivate coagulation factors Va and VIIIa, thus regulating thrombin formation. Qualitative and quantitative deficiencies in protein C and protein S, or defective response to APC, are associated with a significant increase in the risk of venous thromboembolism (VTE). Decreased circulating APC levels have been associated with increased risk of VTE and myocardial infarction, and may also contribute to the increased risk of VTE reported in some hypercoagulable states, such as Behçet's disease and chronic renal failure. In addition to its anticoagulant function, APC also plays significant roles in inflammatory processes, since it prevents the lethal effects of *E. coli*-associated sepsis in animal models, and improves the outcome of patients with sepsis. The anti-inflammatory activity of APC seems to depend on its ability to inhibit the production of tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin-1 β (IL-1 β) from inflammatory cells as well as the activation and extravasation of leukocytes at the site of tissue injury. These functions are dependent on

EPCR. There is clinical evidence that APC inhibits inflammation and fibrosis in the lung, and also that intratracheal administration of APC inhibits the development of lung fibrosis in a mouse model of lung injury. This effect is probably not only due to the ability of APC to suppress cytokine expression, but also to its ability to inhibit platelet-derived growth factor expression. Furthermore, APC may directly modulate endothelial function by suppressing the expression of p50 and p52 nuclear factor- κ B (NF- κ B) subunits, which results in the inhibition of inflammatory cell adhesion.

Besides its anti-inflammatory activity, APC also inhibits apoptosis induced by staurosporine, an effect dependent on the presence of both the protease-activated receptor type 1 (PAR-1) and EPCR, which opens new perspectives to its clinical use in a large variety of diseases. In fact, APC was an effective neuroprotector in a mouse model of ischemic stroke, since it restored cerebral blood flow and thereby caused a reduction in the volume of cerebral infarction. This therapeutic effect is probably due to its anti-apoptotic function as APC protects cortical neurons in mouse from two apoptosis inducers, N-methyl-D-aspartate and staurosporine. This APC neuroprotective effect is also PAR-1 and PAR-3 dependent, and seems to be associated with the modulation of the expression of several genes involved in the endothelial apoptosis pathway, including the Bcl-2 homolog protein and the inhibitor of apoptosis protein. All these new emerging data suggest that APC may suppress pro-inflammatory pathways and stimulate cellular survival mechanisms at the endothelial interface, providing a complex adaptive response at the vessel wall that protects the organism from vascular

*Address correspondence to this author at the Hospital Universitario La Fe, Centro de Investigación, Av. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain; Tel: 34 963862797; Fax: 34 961973018; E-mail: espanya_fra@gva.es

Activated protein C levels in Behçet's disease and risk of venous thrombosis

Silvia Navarro,¹ José María Ricart,²
Pilar Medina,¹ Amparo Vayá,³
Piedad Villa,³ José Todolí,⁴
Amparo Estellés,¹ María Luisa Micó,⁴
Justo Aznar³ and Francisco España¹

¹Research Centre, ²Dermatology Service,
³Department of Clinical Pathology and ⁴Internal
Medicine Service, Hospital Universitario La Fe,
Valencia, Spain

Summary

Behçet's disease is a multi-systemic inflammatory disorder of unknown cause. Most abnormalities have been associated with endothelial injury caused by vasculitis. Thrombosis occurs in about 25% of patients, although the mechanism is unknown. The objective of this study was to evaluate the protein C activation system in Behçet's disease and its correlation with venous thromboembolism (VTE). Thirty-nine patients (12 with VTE) and 78 age- and sex-matched controls were included in the study, and levels of protein C, protein S, activated protein C (APC), protein C inhibitor (PCI), soluble thrombomodulin (TM), antithrombin (AT), α_1 -antitrypsin, fibrinogen, factor VIII, von Willebrand factor (VWF) and C-reactive protein (CRP) were measured. APC and TM levels were significantly lower in patients than in controls, whereas protein S, AT, α_1 -antitrypsin, fibrinogen, factor VIII, VWF and CRP levels were significantly higher in patients than in controls. APC, PCI and TM levels were lower in patients with VTE (0.65 ± 0.19 ng/ml, $86\% \pm 22\%$ and 15.5 ± 7.1 ng/ml respectively) than in those without VTE (0.78 ± 0.17 ng/ml, $100\% \pm 15\%$ and 22.1 ± 15.3 ng/ml) ($P < 0.05$). In patients, APC levels below 0.75 ng/ml (10th percentile of the control group) increased the risk of VTE about fivefold (odds ratio = 5.1; 95% confidence interval = 1.1–23.4). These results show that reduced APC levels are associated with the high incidence of VTE in Behçet's disease.

Keywords: activated protein C, Behçet's disease, thrombomodulin, venous thrombosis, inflammation.

Received 16 March 2004; accepted for
publication 21 May 2004
Correspondence: Dr Francisco España, Hospital
Universitario La Fe, Centro de Investigación,
Av. Campanar, 21, 46009 Valencia, Spain.
E-mail: espanya_fra@gva.es

Behçet's disease is a rare inflammatory, lifelong disorder of unknown cause, characterized by recurrent oral and genital ulceration, and skin lesions (Kaklamani *et al.*, 1998; Sakane *et al.*, 1999). It is a multi-system disease that may involve cutaneous, articular, neurological, intestinal, pulmonary, urogenital or vascular manifestations (Koç *et al.*, 1992; Espinosa *et al.*, 2002). Vascular injuries and autoimmune responses are characteristic of Behçet's disease. Large vessels are affected by vasculitis of the vasa vasorum, and there is a prevalence of vascular involvement that manifests as venous and arterial thrombosis in about 25% of patients (Chajek & Fainaru, 1975; Koç *et al.*, 1992). Venous thromboembolism (VTE) is more common than arterial thrombosis, with deep vein thromboses being the most frequent (Gül *et al.*, 1999). Endothelial dysfunction resulting from vascular inflammation is

considered to be an important factor of thrombosis, although the endothelial injury itself cannot completely explain the hypercoagulable state of the disease because other vasculitis syndromes do not increase the risk of thrombosis (Lee *et al.*, 2002). Other alterations, such as deficiencies of protein C, protein S and antithrombin (AT), or the presence of antiphospholipid antibodies and factor V Leiden and prothrombin 20210A mutations, have been considered. Although some studies found an association between these abnormalities and thrombosis in Behçet's disease (Hull *et al.*, 1984; Chafa *et al.*, 1992; Guermazi *et al.*, 1997; Manno *et al.*, 1997; Mader *et al.*, 1999; Vayá *et al.*, 2000), many other studies did not find any of these abnormalities to be associated with Behçet's disease (Lenk *et al.*, 1998; Nałçacı & Pekçelen, 1998; Mader *et al.*, 1999; Toydemir *et al.*, 2000; Espinosa *et al.*, 2002).

Inherited Abnormalities in the protein C Activation Pathway

Francisco España, Pilar Medina, Silvia Navarro, Amparo Estellés, *Justo Aznar

Research Center and *Department of Clinical Pathology. La Fe University Hospital, Valencia, Spain.

Key Words

Thrombomodulin, endothelial protein C receptor, venous thrombosis, arterial thrombosis, myocardial infarction, protein C activation, mutations.

Abstract

The protein C (PC) anticoagulant pathway plays a crucial role in the regulation of fibrin formation via proteolytic degradation of the procoagulant cofactors factor Va and VIIIa by activated PC (APC). PC circulates in plasma as a zymogen, which is activated, on the surface of endothelial cells by the thrombin-thrombomodulin complex. Another endothelial cell-specific protein, the endothelial cell PC/APC receptor (EPCR), binds PC on the endothelial cell surface and further enhances the rate of PC activation. Normal APC generation depends on the precise assemblage, on the surface of endothelial cells, of at least four proteins: thrombin, thrombomodulin (TM), PC and EPCR. Therefore, any change in the efficiency of this assemblage may cause reduced APC generation and an increase in the risk of thrombosis. In the last years, several reports have suggested the association between mutations in TM and EPC genes and venous and arterial thrombosis. Surprisingly, no studies have been reported linking mutations with lev-

els of circulating APC, the final product of the interaction between thrombin, TM, PC and EPCR. Here, we describe the previously reported mutations in the TM and EPCR genes, and present the design and evaluation of a new strategy to investigate TM, EPCR, PC and prothrombin gene mutations in arterial and venous thrombosis.

Copyright © 2002 S. Karger AG, Basel

Introduction

The protein C (PC) anticoagulant pathway plays a crucial role in the regulation of fibrin formation via proteolytic degradation of the procoagulant cofactors factor Va and VIIIa by activated PC (APC) (1-4). PC circulates in plasma as a zymogen, which is activated, on the surface of endothelial cells by the thrombin-thrombomodulin complex. Another endothelial cell-specific protein, the endothelial cell PC/APC receptor (EPCR), binds PC on the endothelial cell surface and further enhances the rate of PC activation (5).

Normal APC generation depends on the precise assemblage, on the surface of endothelial cells, of at least four proteins: thrombin, thrombomodulin (TM), PC and EPCR (4, 5). Therefore, any change in the efficiency of this assemblage may cause reduced APC generation and an increase in the risk of thrombosis. In the last years, several reports have suggested the association between mutations in TM and EPCR genes and

LOGO KARGER

© 2002 S. Karger AG, Basel
1424-8832/02/0327-0001\$18.50/0

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

Accessible online at:
www.karger.com/journals/pht

Francisco España
Hospital Universitario La Fe - Centro de Investigación - Avda. Campanar, 21
46009 Valencia, Spain
Phone: 34-96-3862797
Fax: 34-96-3868718
E-mail: espanya_fra@gva.es

PUBLICACIONES EN CONGRESOS:

1. España F, Zorio E, Medina P, Palencia A, Estellés A, Osa A, **Navarro S**, Aznar J. Niveles reducidos de Proteína C activada circulante como factor de riesgo de infarto de miocardio. Haematologica 87 (Suplemento 2): 4, 2002.
2. España F, Zorio E, Medina P, Osa A, Estellés A, Palencia MA, **Navarro S**, Aznar J. Low levels of circulating activated protein C are a risk factor for myocardial infarction. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis 32 (Suplemento 2): 61, 2002.
3. España F, Vayá A, Villa P, Todolí J, Calvo J, Ricart JM, Medina P, Estellés A, Micó ML, **Navarro S**, Aznar J. Circulating activated protein C in bechet's disease and risk of thrombosis. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2003; Supplement 1 (July): P0014.
4. Medina P, Mira Y, Villa P, Estellés A, Vayá A, **Navarro S**, Ferrando F, Aznar J, Bertina RM, Woodhams B, Migaud-Fressart M, España F. The 4678G/C polymorphism in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene is associated with plasma levels of soluble EPCR. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2003; Supplement 1(July): P0026.
5. **Navarro S**, Medina P, Vayá A, Estellés A, Villa P, Mira Y, Ferrando F, Aznar J, Bertina RM, España F. The 4678G/C polymorphism in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene reduces the risk of venous thromboembolism in carriers of the Factor V Leiden mutation. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2003; Supplement 1(July): OC057.
6. España F, Medina P, Estellés A , **Navarro S** , Aznar J. Factores Hemostáticos de Riesgo Genético en Trombosis Venosa y Arterial. Revista de Diagnóstico Biológico (Vol. LII, Nº 3): 166-178, 2003.
7. **Navarro S**, Vayá A, Villa P, Todolí J, Calvo J, Ricart JM, Medina P, Estellés A, Micó ML, Aznar J, España F. Proteína C activada circulante en la enfermedad de Behçet y riesgo de trombosis. Haematologica 88 (Suplemento 7): 31, 2003.
8. España F, Deguchi H, Medina P, **Navarro S**, Vayá A, Estellés A, Villa P, Mira Y, Lee YM, Ferrando F, Aznar J, Griffin JH. Efecto sinérgico entre deficiencias plasmáticas de proteína C activada y de glucosilceramida para el tromboembolismo venoso. Haematologica 88 (Suplemento 7): 31, 2003.
9. Medina P, Mira Y, Villa P, Estellés A, Vayá A, **Navarro S**, Ferrando F, Aznar J, Bertina RM, Woodhams B, Migaud-Fressart M, España F. El polimorfismo 4678G/C en el gen del receptor endotelial de la proteína C (EPCR) está asociado con los niveles de EPCR soluble en plasma. Haematologica 88 (Suplemento 7): 29, 2003.

10. Medina P, **Navarro S**, Estellés A, Villa P, Mira Y, Vayá A, Ferrando F, Bertina RM, Aznar J, España F. El polimorfismo 4678G/C en el gen del receptor endotelial de la proteína C reduce el riesgo de tromboembolismo venoso en portadores de la mutación Factor V Leiden. Haematologica 88 (Suplemento 7): 28, 2003.
11. Zorio E, España F, Osa A, Medina P, Palencia M, Arnau M.A, **Navarro S**, Almenar L, Aznar J, Estellés A. Niveles bajos de proteína C activada, marcador de enfermedad coronaria difusa en jóvenes con infarto de miocardio. Latido (Vol: 10, Nº 2, LXII): 90 , 2004.
12. España F, Medina P, **Navarro S**, Estellés A, Aznar, J. El sistema multifuncional de la proteína C. Haematologica 89 (Suplemento 2): 20-25, 2004.
13. Medina P, **Navarro S**, Estellés A, Vayá A, Mira Y, Villa P, Ferrando F, Aznar J, Bertina R.M, España F. Contribución de polimorfismos en el gen del receptor endotelial de la proteína C (EPCR) a los niveles de EPCR soluble y proteína C activada, y riesgo trombótico. Haematologica 89 (Suplemento 2): 17, 2004.
14. **Navarro S**, Zorio E, Medina P, Estellés A, Osa A, Palencia M.J, Almenar L, Aznar J, España F. Los valores reducidos de proteína C activada están asociados con infarto de miocardio a edad temprana y son un marcador de enfermedad coronaria difusa. Haematologica 89 (Suplemento 2): 18, 2004.
15. Zorio E, España F, Osa A, Arnau M.A, Palencia M, Medina P, **Navarro S**, Estellés A. Niveles de proteína C activada circulante, inversamente relacionados con la extensión de la enfermedad coronaria en jóvenes con infarto de miocardio. Rev Esp Cardiol. 57 (Suplemento 2): 168, 2004.
16. **Navarro S**, Zorio E, Medina P, Estellés A, Osa A, Palencia MA, Cubillo P, Aznar J, España F. Decreased plasma levels of activated protein C in young survivors of myocardial infarction: relationship with the extent of coronary artery disease. Journal of Thrombosis and Haemostasis 3 (Supplement 1), 2005. P1329
17. Medina P, **Navarro S**, Estellés A, Vayá A, Villa P; Ferrando F, Bertina RM, Aznar J, España F. Influence of polymorphism in the endothelial protein C receptor gene on the risk of venous thromboembolism in carriers of the Factor V Leiden mutation. Journal of Thrombosis and Haemostasis 3 (Supplement 1), 2005: P0730.
18. Medina P, **Navarro S**, Estellés A, España F. The C1418T polymorphism in the trombosmodulin gene is associated with increased levels of circulating activated protein C and with reduced risk of venous thromboembolism. Journal of Thrombosis and Haemostasis 3 (Supplement 1), 2005: P1328.
19. **Navarro S**, Zorio E, Medina P, Estellés A, Osa AM, Palencia MA, Cubillo P, Aznar J, España F. Niveles reducidos de proteína C activada circulante en jóvenes supervivientes de infarto de miocardio: su relación con la inflamación y con la extensión de la enfermedad coronaria. Haematologica 90 (Suplemento 2): 37. 2005.

20. Medina P, **Navarro S**, Vayá A, Estellés A, Mira Y, Villa P, Ferrando F, Aznar J, Bertina RM, España F. Nuevas mutaciones en los genes que codifican las proteínas componentes del sistema de activación de la proteína C. Haematologica 90 (Suplemento 2): 32. 2005.
21. Medina P, **Navarro S**, Estellés A, Vayá A, Mira Y, Villa P, Ferrando F, Aznar J, Bertina RM, España F. Influencia de los polimorfismos en el gen del receptor endotelial de la proteína C sobre el riesgo de trombosis venosa en portadores de factor V Leiden. Haematologica 90 (Suplemento 2): 45. 2005.
22. España F, Medina P, **Navarro S**, Estellés A, Zorio E, Cubillo P, Aznar J. Inflamación y enfermedad cardiocascular. Haematologica 90 (Suplemento 1): 298-308. 2005.
23. Zorio E, **Navarro S**, Medina P, Rueda J, Palencia M, Arnau MA, Almenar L, Salvador A, Estellés A, España F. Tres scores de aterosclerosis coronaria, inversamente relacionados con los niveles de proteína C activada circulante en jóvenes supervivientes de infarto de miocardio.
24. Cubillo P, Zorio E, **Navarro S**, Medina P, Arnau MA, Rueda J, Palencia M, Salvador A, Estellés A, España F. Levels of activated protein C inversely correlated with three coronary arteriosclerosis scores in young survivors of myocardial infarction (MI). Atherosclerosis Vol. 7 No.3: 395. 2006.
25. Medina P, **Navarro S**, Mira Y, Villa P, Ferrando F, Vayá A, Estellés A, Bertina RM, España F. El polimorfismo C1418T del gen de la trombomodulina está asociado con los niveles plasmáticos de trombomodulina soluble y de proteína C activada, y con una reducción en el riesgo de trombosis venosa. Haematologica 91 (Suplemento 2): 25, 2006.
26. **Navarro S**, Medina P, Estellés A, Vayá A, Cubillo P, Mira Y, Villa P, Ferrando F, Bertina RM, España F. Endothelial protein C receptor A1 and A3 haplotypes and the risk of venous thromboembolism in carriers of the prothrombin G20210A mutation. J. Thromb. Haemost. 5 (Suplement 2), 2007: P-S-476.
27. Medina P, **Navarro S**, Mira Y, Estellés A, Vayá A, Villa P, Ferrando F, Cubillo P, Bertina RM, España F. Prothrombin and F1+2 levels are significantly increased in symptomatic compared with asymptomatic family members carrying the prothrombin G20210A mutation. J. Thromb. Haemost. 5 (Suplement 2), 2007: P-S-477.
28. **Navarro S**, Deguchi H, Medina P, Estellés A, Griffin JH, España F. *Los niveles reducidos de glucosilceramida están asociados con un mayor riesgo de tromboembolismo venoso.* Haematologica 92 (Supl. 2): 46, 2007.
29. **Navarro S**, Medina P, Mira Y, Estellés A, Villa P, Ferrando F, Vayá A, Bertina RM, España F. *Los niveles de protrombina y fragmento F1+2 en portadores de la mutación G20210A están significativamente más elevados en los familiares con historia de trombosis venosa que en los asintomáticos.* Haematologica 92 (Supl. 2): 47, 2007.

30. Navarro S, Medina P, Marín F, Zorio E, Roldán V, Estellés A, Fontcuberta J, Arnau MA, Corral J, Santamaría A, Rueda J, Vicente V, España F. *El haplotipo H3 del gen del receptor endotelial de la proteína C reduce el riesgo de infarto de miocardio precoz.* Haematologica 92 (Supl. 2): 49, 2007.
31. Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Mira Y, Ferrando F, Villa P, Bertina RM, España F. *Influencia de los haplotipos H1 y H3 del gen del receptor endotelial de la proteína C (EPCR) y de los niveles de EPCR soluble sobre el riesgo de trombosis venosa en portadores de la mutación G20210A de la protrombina.* Haematologica 92 (Supl. 2): 45, 2007.
32. Medina P, Martínez-Sales V, Navarro S, Estellés A, España F. *Los niveles de receptor endothelial de la proteína C soluble y unido a la membrana de la célula endotelial están asociados a dos haplotipos del gen del EPCR.* Haematologica 92 (Supl. 2): 45, 2007.
33. Alfonso P, Navarro S, Medina P, España F, Irún P, Giraldo P, Pocoví M. *A common variant in the glucosylceramide synthase gene is associated with disease severity in N370S homozygous Gaucher disease patients.* Poster Abstracts: 8th International Symposium on Lysosomal Storage Disorders: 72. 2008.
34. Navarro S, Medina P, Corral J, González-Porras JR, Martínez-Sales V, Estellés A, Vayá A, Roldán V, Ferrando F, Ordóñez A, Alberca I, Ferrando M, Mira Y, Vicente V, España F. *El alelo 455Val del polimorfismo C1418T del gen de la trombomodulina es funcional, reduce el riesgo de trombosis venosa y está asociado con niveles aumentados de trombomodulina soluble y de proteína C activada, y con una mayor expresión génica.* Haematologica 93 (Supl. 2): 7, 2008.
35. Navarro S, Deguchi H, Medina P, Estellés A, Griffin JH, España F. *Detección de mutaciones en el gen de la glucosilceramida (GlcCer) sintasa y estudio de su asociación con niveles de GlcCer y con el tromboembolismo venoso.* Haematologica 93 (Supl. 2): 12, 2008.
36. Medina P, Navarro S, Zorio E, Estellés A, España F. *Nuevas acciones biológicas del sistema de la proteína C.* Haematologica 93 (Supl. 1): 161-68, 2008.
37. Alfonso P, Navarro S, Medina P, Pampín S, Rodríguez-Rey JC, Giraldo P, España F, Pocoví M. *Asociación entre variantes en el gen de la glucosilceramida sintasa y la gravedad de la enfermedad de Gaucher tipo 1.* Haematologica 93 (Supl. 2): 115, 2008.