

**ANÁLISIS DE LA TROMBOFILIA HEREDITARIA: CONTRIBUCIÓN DE
FACTORES GENÉTICOS EN LA PREDISPOSICIÓN AL
TROMBOEMBOLISMO VENOSO EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA**

Tesis presentada por

M^a Isabel Tirado García

Para optar al grado de Doctora en Farmacia

Directores: Dr. Jordi Fontcuberta y Dr. José Manuel Soria

Tutor: Dr. Ramón Segura

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Jordi Fontcuberta Boj, Jefe de la Unitat d'Hemostàsia i Trombosi, y José Manuel Soria Fernández del Departament d'Hematologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

CERTIFICAN:

Que la tesis “ANÁLISIS DE LA TROMBOFILIA HEREDITARIA: CONTRIBUCIÓN DE FACTORES GENÉTICOS EN LA PREDISPOSICIÓN AL TROMBOEMBOLISMO VENOSO EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA” presentada por la Licenciada en Farmacia M^a Isabel Tirado García para optar al grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizada bajo nuestra dirección y se encuentra en condiciones de ser leída.

Dr. Jordi Fontcuberta Boj

Dr. José Manuel Soria Fernández

BARCELONA, 21 de julio de 2004

A Javier
A mis hijas Marta y Laura
A mi padre, Manuel, a quien le debo el ánimo de estudiar
A mi madre, Carmen
A mis hermanos, M^a Carmen, Francesc Manel y Xavier
A todos mis sobrinos
A Marino y Rosa

A Jordi Fontcuberta, por estimularme y dirigir esta tesis. En el ámbito personal, por su apoyo incondicional, como excelente profesional de la medicina, de los que hacen escuela. Es una persona de referencia en el ámbito de la Trombosis, que ha sido capaz de generar un grupo investigación básica y clínica, reconocido en el ámbito nacional e internacional.

A José Manuel Soria, por haber sido el motor de este trabajo y por haber confiado en mi desde el principio de llegar a nuestro laboratorio. Por enseñarme que siempre se aprende de la experiencia que uno mismo va adquiriendo. Sin duda es una de las personas más optimistas que he conocido, con un gran espíritu de superación en el campo de la investigación genética.

A Miquel Rutllant, por conseguir generar un Departamento de Hematología de prestigioso nivel. Por saber reconocer profesionalmente a todas las personas de su equipo. Por estar siempre accesible y dejar la puerta abierta a cualquier duda o consulta necesaria.

A José Mateo porque, además de ser un buen hematólogo y un gran amigo ha sido mi principal profesor en el mundo de la informática y en el de la clínica trombótica. Por todo ello ha sido más fácil llevar a cabo mis primeras bases de datos y mi navegación por los datos clínicos y biológicos. Además de ser una persona capaz de dar la seguridad y el rigor que necesita un buen grupo de trabajo asistencial.

A Arturo Oliver, por su amistad, por ser un buen hematólogo y experto estadístico, siempre dispuesto a resolver las mil y una dudas sobre los análisis necesarios para realizar un buen trabajo.

Al profesor William Stone, por su colaboración incondicional en cada una de sus lecciones magistrales, de como elaborar un artículo científico en todo su conjunto y en un correcto inglés.

Al Dr. Ramón Segura por ser el tutor de esta tesis, por su apoyo y por el seguimiento realizado en todo momento.

A Montse Borrell, en el ámbito profesional y personal por animarme y apoyarme desde un principio. Por ser la persona de referencia en nuestro laboratorio de proteínas, por su absoluta disponibilidad a resolver cualquier cuestión que pueda surgir.

A Elisabeth Martínez-Sanchez, por su gran amistad y por la serenidad que desprende de manera natural. Por estar siempre a mi lado para poder compartir todas las experiencias, del día a día.

Al equipo del laboratorio de trombofilia, Elisabet Martínez-Marchán por su simpatía, María Sabater, Carolina Mordillo, Ramón Souto y Carme Cabrera, por compartir factores genéticos y factores ambientales en el rasgo complejo de colaboradores de laboratorio. Y de manera muy especial a Cristina Vallvé, por ser tan fácil y agradable trabajar en grupo con ella.

A Alfonso Buil, informático y experto en estadística genética que ha hecho más fácil y accesible a todos el arduo trabajo de las bases de datos, indispensables en un laboratorio asistencial y de investigación.

A todos mis compañeros del laboratorio de coagulación, por hacer posible todo lo que se llega a realizar en nuestra Unidad y conseguir una elevada fiabilidad de los datos obtenidos en cada momento: Rosa Felices, Teresa Urrutia, Imma Coll, Mercè Garí, Quino Murillo, Dolors Llobet, Rosa Ortin, Ruth Forner. A Loreto Segriá, por su sincera confianza.

A las administrativas de nuestra Unidad, M^a Jesús Gallego y Beatriz Carreras, por su amistad, por hacer posible todo el proceso de la obtención de los datos básicos para el buen funcionamiento de la Unidad. Por estar siempre dispuestas a resolver cualquier duda y a colaborar en cualquier momento.

A Amparo Santamaría por su amistad y por su dedicación plena a cualquier protocolo que se proponga.

A todos los médicos de la Unidad que hacen posible toda la parte asistencial y de investigación clínica: Juan Carlos Souto, Nuria Pujol e Isabel Monserrat.

A Montse Baiget, Elisabet del Río y Montse Domenech, del Departamento de Genética, por facilitarme y asesorarme de como sobrevivir a los inicios de un nuevo laboratorio de genética. Y a M^a Jesús Barceló con la que he compartido también experiencias en el laboratorio de genética.

Al Dr. Francisco Blanco, del Departamento de Bioquímica, por su participación en las determinaciones en su laboratorio para el estudio de la homocisteína

A todo el personal de la Unidad de Extracciones, por facilitar la recogida de muestras desde un simple protocolo a cualquier complejo estudio familiar. Muy especialmente a Manolo Escobar y a Maria Badía dispuestos siempre a colaborar.

Al resto de compañeros del Hospital que me pueda olvidar, por su absoluta dedicación.

ÍNDICE	
Glosario de abreviaturas	15
INTRODUCCIÓN	17
1. Introducción a la hemostasia y a la trombosis	19
1.1 La coagulación.	21
1.2 Endotelio	23
1.3 Plaquetas y Hemostasia	24
1.4 Sistema extrínseco	25
1.5 Sistema intrínseco	25
1.6 Vía Común	26
1.7 Fibrinolisis	27
1.8 Inhibición de la coagulación	28
2. Trombofilia	31
2.1 La trombofilia hereditaria	31
2.2. Trombosis recurrente	35
2.3. Bases moleculares de la trombofilia hereditaria	37
2.3.1 Deficiencia de antitrombina	37
2.3.2 Deficiencia de proteína C	38
2.3.3 Deficiencia de proteína S	40
2.3.4 Resistencia a la PC activada (RPCa)	42
2.3.4.1 FV Arg506Gln (FV Leiden)	42
2.3.4.2 Otras mutaciones descritas en el gen <i>F5</i> asociadas a la RPCa	44
2.3.4.3 Implicaciones de otros genes en el fenotipo RPCa	44
2.3.5 Mutación PT20210	45
2.3.6 Polimorfismo Val34Leu del gen del FXIII	46
2.3.7 Grupos sanguíneos no-O	46
2.3.8 Incremento de los niveles de factores de la coagulación	47
2.3.8.1 Niveles elevados de FVIII	47
2.3.8.2 Niveles elevados de FIX, FXI y fibrinógeno	48
2.3.9 Hiperhomocisteinemia	48
2.3.10 Otros factores potenciales de trombofilia hereditaria	49
2.4 Prevalencia de los factores de riesgo de trombosis venosa	50

3. Métodos de estudio de la trombofilia	53
3.1. Estudios de asociación	54
3.1.1 Estudios caso-control	54
3.1.2 Estudios de asociación en familias con trombofilia	56
3.2. Estudios de ligamiento genético	57
3.3. Interacción gen-gen	59
3.4. Interacción gen-ambiente	61
4. Futuro del estudio de la trombofilia	62
OBJETIVOS	65
MATERIAL Y MÉTODOS	69
1. Población estudiada	71
1.1. Grupo caso-control	71
1.2. Familias con trombofilia con algún factor de riesgo trombótico conocido	74
1.3. Familias con trombofilia idiopática	79
1.4. Datos clínicos recogidos en los estudios	81
2. Métodos	85
1. Determinaciones plasmáticas	85
1.1 Pruebas de coagulación del estudio básico de hemostasia	85
1.2 Determinaciones funcionales mediante pruebas coagulométricas	85
1.3 Determinaciones mediante sustratos cromogénicos.	87
1.4 Análisis tipo enzima-inmunoensayo (ELISA)	88
1.5 Electroinmunoensayo	90
2 Análisis genéticos	91
2.1 Lavado de sangre y lisis de los eritrocitos	91
2.2 Extracción del ADN	91
2.2.1 Método: "Salting out procedure"	91
2.2.2 Extracción rápida	94
2.3 Detección de mutaciones	94
2.3.1 Detección de la mutación Factor V Leiden (FVL; Arg506Gln)	96
2.3.2 Detección en el gen de la protrombina de la mutación PT20210A	97
2.3.3 Detección múltiple de las mutaciones FVL y PT20210A	98
2.3.4 Detección del polimorfismo A4070G del gen <i>F5</i>	99
2.3.5 Detección del polimorfismo C46T del gen <i>F12</i>	100

2.3.6 Determinación del genotipo del grupo sanguíneo del sistema ABO	101
2.4 Electroforesis en geles de agarosa	104
2.5. Secuenciación automática	105
2.6. Genotipación del polimorfismo C46T del gen <i>F12</i> por hibridación con sondas fluorescentes	106
3. Métodos estadísticos	109
3.1 Estudio de asociación: caso-control	109
3.2 Estudio de asociación en familias con algún factor de riesgo trombótico conocido.	110
3.3 Estudio de ligamiento genético	111
PUBLICACIONES	113

Trabajo nº 1:

Patients with venous thromboembolism have a lower APC response than controls. Should this be regarded as a continuous risk factor for venous thrombosis? *Haematologica*. 1999; 84: 470-472.

Trabajo nº 2:

Identification of a large deletion and three novel mutations in exon 13 of the factor V gene in a Spanish family with normal factor V coagulant and anticoagulant properties. *Hum Genet*, 2002; 111: 59-65.

Trabajo nº 3:

Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. *Blood*, 2000; 95: 2780-2785.

Trabajo nº 4:

Contribution of prothrombin 20210A allele and factor V Leiden mutation to thrombosis risk in thrombophilic families with other hemostatic deficiencies. *Haematologica* 2001; 86: 1200-1208.

Trabajo nº 5:

Association after linkage analysis indicates that homozygosity for the 46C→T polymorphism in the *F12* gene is a genetic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2004; 91: 899-904.

Trabajo nº 6:

Rapid detection of the 46C→T polymorphism in the Factor XII gene, a novel genetic risk factor for thrombosis, by melting peak analysis using fluorescence hybridization probes. *Genetic Testing* 2003; 7:295-301.

Trabajo nº 7:

Complexity of the genetic contribution of different thrombotic risk factors in a Spanish thrombophilic family. *Thromb Haemost. Sometido.*

Trabajo nº 8:

The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost. Sometido.*

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	183
DISCUSIÓN CONJUNTA	205
CONCLUSIONES	223
BIBLIOGRAFÍA	227

Glosario de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario.

ARN: ácido ribonucleico.

AT: antitrombina.

APA: anticuerpos antifosfolípidicos que incluye, anticuerpos tipo IgG anticardiolipina y antifosfatidilserina y anticuerpos tipo IgM anticardiolipina y antifosfatidilserina.

FV: factor V de la coagulación sanguínea.

FVL: mutación factor V Leiden, G1691A en el exón 10 del gen *F5*.

FVA4070G: polimorfismo A4070G en el exón 13 del gen *F5*

FVIII: factor VIII de la coagulación sanguínea.

FXII: factor XII de la coagulación sanguínea.

FXIIC46T: mutación C46T en el gen *F12*.

FXIII: factor XIII de la coagulación sanguínea.

GAIT: “*Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia*”, Análisis Genético de la trombofilia inexplicada.

Heredabilidad (h^2): proporción de la variancia fenotípica total atribuido al efecto de los genes.

Locus genético: una posición en la secuencia del ADN, definida con relación a las otras. En contexto diferente puede significar un sitio polimórfico específico o una gran región de la secuencia del ADN en dónde se puede localizar un gen. En latín, el plural es loci.

LOD: logaritmo en base 10 del cociente entre dos verosimilitudes o probabilidades: probabilidad de que un conjunto específico de datos refleje el ligamiento entre los dos *loci*, entre la probabilidad de que esos mismos datos reflejen la ausencia de ligamiento.

OR (Odds ratio): cociente o razón entre 2 *odds*. A su vez la *odds* es una razón en la que el numerador es la probabilidad (p) de que ocurra un suceso y el denominador es la probabilidad de que tal suceso no ocurra ($1-p$). La OR es una medida clásica en epidemiología de la asociación entre un factor de riesgo y una enfermedad.

PAI-1: inhibidor del activador tisular del plasminógeno tipo I

PC: proteína C.

PS: proteína S.

PT: niveles plasmáticos de protrombina.

PT20210A: variante alélica G20210A en el gen de la protrombina.

QTL: *locus* de rasgo cuantitativo (*quantitative trait locus*); cualquier *locus* que influye sobre la variabilidad de un fenotipo complejo.

RPCa: resistencia a la proteína C activada.

rPCa: expresión de la medida de la RPCa, que expresa los resultados mediante la razón de la TTPA (tiempo de tromboplastina parcial activada) en presencia de proteína C activada (PCa), respecto a la TTPA sin PCa.

SNP: es un polimorfismo que implica el cambio de sólo un nucleótido (base) de la secuencia del ADN (SNP: *single nucleotide polymorphism*).

TF: Factor tisular.

TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular (*tissue factor pathway inhibitor*).

t-PA: activador tisular del plasminógeno.

TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activada.

TVP: trombosis venosa profunda.

INTRODUCCIÓN

1- Introducción a la Hemostasia y a la Trombosis

La hemostasia es un sistema que mantiene la sangre en un estado fluido bajo condiciones fisiológicas, pero que permite reaccionar frente a una lesión vascular de manera muy rápida para detener el sangrado taponando la posible lesión vascular. La hemostasia incluye un sistema coagulativo y otro sistema fibrinolítico, ambos compuestos de activadores, zimógenos, cofactores, superficies celulares (tales como la de las plaquetas), e inhibidores. La función y regulación de estos complejos sistemas han sido extensamente estudiados, proporcionando, en las últimas décadas, un amplio conocimiento en este campo (Spronk *et al.*, 2003). Simplificando, existe un balance entre un mecanismo procoagulante, que favorece la hemostasia y la trombosis y un mecanismo anticoagulante, que previene la generación excesiva de trombina cuando se activa la coagulación. Este equilibrio está determinado por la activación / inactivación (inhibición) de los factores de la coagulación y de los factores fibrinolíticos, o modulando los niveles de los mismos.

Cuando se altera este equilibrio en la dirección procoagulante, se producen factores que predisponen a la trombosis. Hace casi 150 años, Virchow (Virchow 1860) ya postulaba que la trombosis venosa podía ser debida a diferentes factores: enlentecimiento del flujo (estasis), alteraciones de la pared vascular y alteraciones de la composición de la sangre. Por otro lado, este balance puede alterarse en sentido contrario, debido a defectos en algunos factores implicados en el sistema de la coagulación y se puede generar una predisposición al sangrado.

La trombosis puede ocurrir cuando existe un desequilibrio en el balance entre los factores procoagulantes y los mecanismos anticoagulantes a favor de los primeros.

Actualmente los factores protrombóticos mejor estudiados son:

- 1- Alteración de las células endoteliales.
- 2- Pérdida del endotelio y exposición del subendotelio.
- 3- Activación de las plaquetas por agonistas circulantes o por su interacción con el colágeno subendotelial o el factor von Willebrand (vWF).
- 4- Activación de la coagulación.
- 5- Inhibición de la fibrinólisis.
- 6- Estasis.

Y por otro lado los mecanismos antitrombóticos son:

- 1- Las propiedades antitrombóticas de factores liberados por el endotelio intacto.
- 2- La neutralización de los factores activados de la coagulación por componentes unidos al endotelio como la trombomodulina.
- 3- La inhibición de los factores activados de la coagulación por inhibidores naturales.
- 4- La dilución de los factores activados y disrupción de agregados plaquetarios por el flujo sanguíneo.
- 5- El aclaramiento de factores activados por el hígado.
- 6- La disolución de los trombos de fibrina por el sistema fibrinolítico.

Los trombos pueden formarse en cualquier localización del sistema cardiovascular, incluyendo las venas, las arterias, el corazón y la microcirculación. Están formados por fibrina y células sanguíneas. El trombo arterial se forma en un ambiente de flujo rápido y está formado principalmente por agregados de plaquetas unidos a filamentos de fibrina (Baumgartner 1973). El trombo venoso se forma en áreas de estasis y está compuesto por hematíes con una gran cantidad de fibrina y relativamente pocas plaquetas (Hirsh *et al.*, 2001).

Las manifestaciones clínicas del tromboembolismo venoso dependen de la localización y extensión del trombo, pudiendo clasificarse en tres grupos: tromboflebitis superficial, trombosis venosa profunda y embolismo pulmonar. La tromboflebitis superficial, en general, sólo da problemas locales: dolor, calor, hinchazón. En la trombosis venosa profunda generalmente los trombos aparecen en las extremidades inferiores y en ocasiones pueden originar síntomas agudos, produciendo inflamación de la pared venosa, obstrucción al flujo y en ocasiones se embolizan en la circulación pulmonar (embolia pulmonar). Además puede producir a largo plazo lesiones en las válvulas venosas de las extremidades inferiores dando lugar al síndrome postflebítico. El embolismo pulmonar se suele desencadenar inicialmente a partir de un trombo originado en las venas profundas de las extremidades inferiores, usualmente trombos extendidos o producidos en las venas poplíteas o anteriores (Having 1977).

Aunque no existen datos precisos, la incidencia del tromboembolismo venoso se ha incrementado a lo largo del tiempo, quizás por el aumento de la esperanza de vida, el

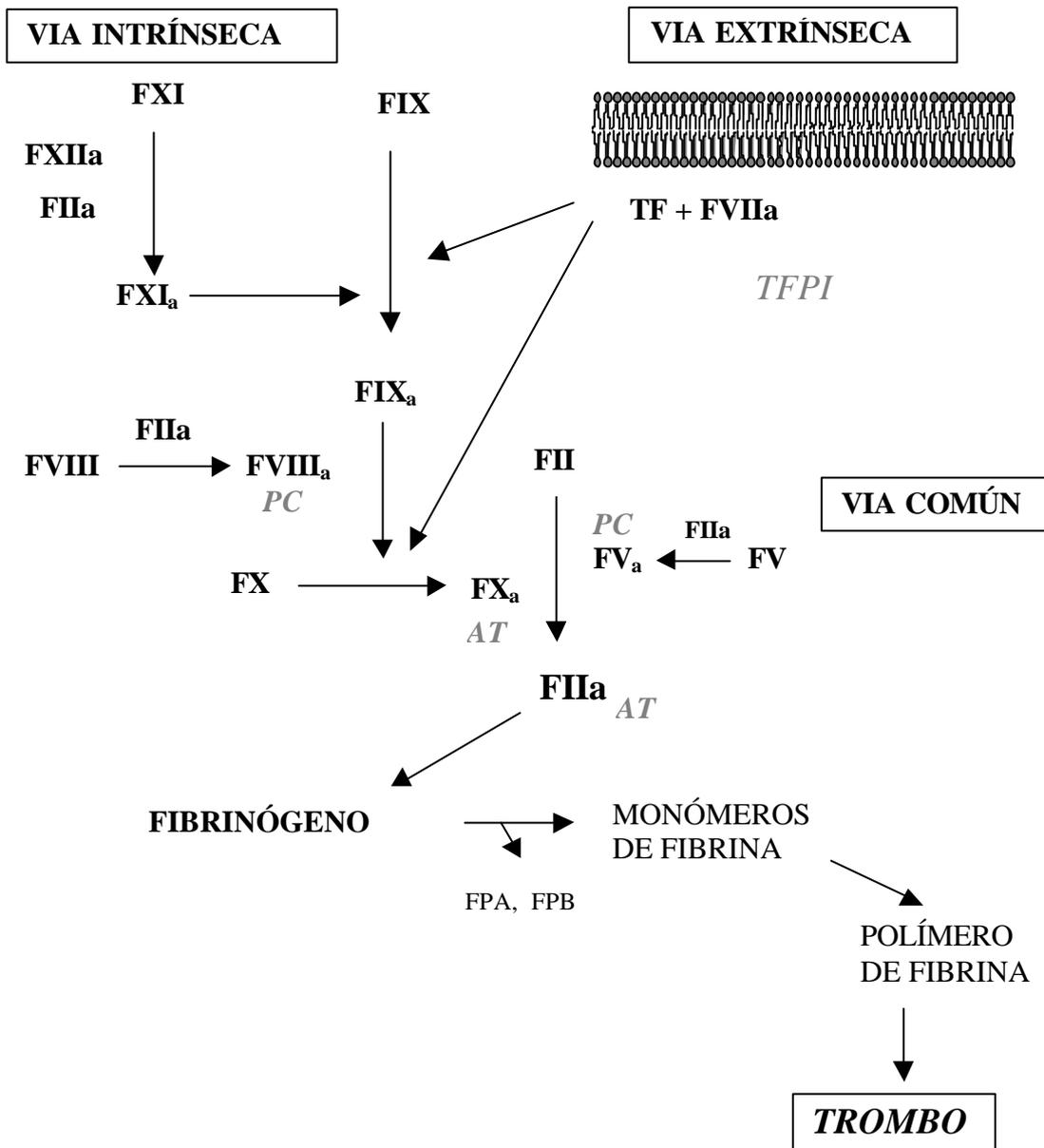
cambio en los hábitos alimentarios, el actual estilo de vida más sedentario y por los nuevos métodos diagnósticos. En este momento constituye la tercera enfermedad cardiovascular más frecuente después de los accidentes cerebrovasculares y el infarto agudo de miocardio (Goldhaber 1994; Nordstrom *et al.*, 1992).

1.1- La coagulación

La coagulación sanguínea y la hemostasia primaria, mediada por las plaquetas, representan los mecanismos de defensa ante la hemorragia. El sistema de la coagulación se inicia en respuesta a una lesión del endotelio (Spronk *et al.*, 2003; Mackman 2004), el cual permite una exposición directa de la sangre al subendotelio. La activación del sistema de la coagulación esta coordinado con la formación de un tapón plaquetario que inicialmente ocluye la lesión vascular (hemostasia primaria), y ambos sistemas garantizan la formación de un trombo hemostático. Existen mecanismos anticoagulantes que en condiciones normales, previenen los procesos procoagulantes. Anomalías en este balance natural entre sistemas procoagulantes y anticoagulantes, debido a factores genéticos o adquiridos, pueden desencadenar enfermedades trombóticas o hemorrágicas.

La coagulación sanguínea engloba una cascada de reacciones bioquímicas (Macfarlane 1964), las cuales se propagan mediante complejos enzimáticos que contienen una serinproteasa, vitamino-K dependiente, y proteínas que actúan como cofactor que se unen sobre la superficie de membrana (figura 1). Todas las reacciones implican la activación de precursores inactivos (zimógenos), de una serie de serinproteasas plasmáticas, que son transformadas a su forma enzimática activa. La activación se lleva a cabo mediante una lisis del péptido de activación y un posterior cambio conformacional del dominio catalítico dejando libre el centro activo. A cada enzima le corresponde activar un procofactor a cofactor, produciendo una secuencia de reacciones en las cuales el producto activado sirve para la activación del siguiente enzima, aumentando la velocidad y eficiencia de reacción de manera exponencial (Macfarlane 1964). Además para llevarse a cabo estas reacciones con una eficiencia catalítica adecuada, necesitan unirse a superficies fosfolipídicas de membrana (Spronk 2003) en la superficie de las plaquetas, las células del endotelio vascular u otras células de sangre periférica, especialmente los monocitos activados. La mayoría de estas reacciones son muy dependientes de iones de calcio (Ca^{2+}) y de fosfolípidos, con excepción de la interacción de la trombina (FIIa) con el fibrinógeno.

Figura 1. Representación esquemática de la cascada de coagulación. Los factores están indicados por la letra F seguido de números romanos y las formas activas: "a". De color gris se indican los diferentes inhibidores de la coagulación.



1.2- Endotelio

El endotelio normal intacto tiene propiedades antitrombóticas y no activa ni las plaquetas ni los factores de la coagulación. Además, el endotelio contiene y elabora componentes que neutralizan los factores de coagulación activados, inhiben la agregación y la adhesión de las plaquetas y proporcionan una superficie para la activación de la fibrinólisis (Cines *et al.*, 1998).

El endotelio vascular normal mantiene la sangre fluida mediante la producción de inhibidores de la coagulación, como son la trombomodulina y el heparán sulfato. Tras generarse trombina, ésta se une a la trombomodulina y pierde su actividad procoagulante (de activar los factores FV, FVIII, FXII, fibrinógeno,...). El complejo formado por trombina-trombomodulina activa la PC, cuya principal función es inactivar los factores FVIIIa y FVa, bloqueando la generación de FXa y FIIa. El endotelio inhibe también la agregación plaquetaria al liberarse prostaglandina PGI₂ y óxido nítrico (NO). Además, activa la fibrinólisis mediante la síntesis y secreción de sus activadores, el t-PA (activador tisular del plasminógeno), y activador del plasminógeno tipo urokinasa (UK) (Cines *et al.*, 1998). Así, el endotelio modula el tono vascular, proporcionando una envoltura protectora separando los componentes de la sangre de las estructuras reactivas del subendotelio (Michiels 2003). Estas propiedades contribuyen a su tromborresistencia y se pierden o se modifican, cuando el endotelio se estimula o se lesiona.

Las células endoteliales son activadas cuando se exponen a endotoxina, citocinas como la interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF) y la trombina entre otros. Las células endoteliales estimuladas sintetizan el factor tisular (TF) y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) (Sidelmann *et al.*, 2000) e internalizan la trombomodulina. El endotelio lesionado muestra propiedades proagregantes, ya que disminuye la liberación de PGI₂ y aumentan la secreción de PAF (factor activador de las plaquetas). También aumenta la liberación de multímeros vWF de alto peso molecular, que contribuirán al aumento de la adhesión plaquetaria en la pared del vaso dañado. Cuando las células endoteliales severamente lesionadas se pierden, el subendotelio se expone a las plaquetas y a los factores de coagulación. Las plaquetas se unen al subendotelio a través de una interacción que implica a las glicoproteínas (GP) de membrana, principalmente la GP-Ib, con las proteínas subendoteliales: el vWF, el colágeno, la fibronectina y la vitronectina.

Cuando las plaquetas interactúan con el subendotelio, las plaquetas se adhieren y se agregan entre sí, formando un trombo mural que es eventualmente estabilizado por fibrina.

1.3- Plaquetas y hemostasia

Las plaquetas son esenciales para una hemostasia efectiva mediante múltiples interacciones con los factores de la coagulación plasmática (George *et al.*, 2001). Las plaquetas juegan un papel importante en la coagulación sanguínea al aportar fosfolípidos de membrana cargados negativamente, receptores de membrana de la superficie plaquetaria, liberación local de factores procoagulantes (factor plaquetario 4, PAI-1, FV o fibrinógeno) y la interacción estructural con el coágulo de fibrina.

La hemostasia primaria es un término que a veces se utiliza para describir el proceso donde las plaquetas agregan y forman un tapón en los pequeños vasos sanguíneos sin aparente requerimiento de la generación de trombina (Baumgartner, 1973).

La adhesión plaquetaria esta mediada principalmente por la interacción de los receptores en las membranas de la superficie plaquetaria (glicoproteínas) y su interacción con el plasma y las proteínas asociadas a superficie, principalmente el fibrinógeno, la fibronectina y el vWF. En un alto porcentaje es el complejo glicoproteico GP Ib-IX, cuyo principal ligando es el vWF. En la reacción de liberación plaquetaria, se liberan entre otros componentes, el ADP (adenosina-5'-difosfato) y Ca^{2+} y otras proteínas como el fibrinógeno, el FV, el vWF, el HMWK (kininógeno de alto peso molecular), la α_1 -antitripsina y la α_2 -macroglobulina. El ADP y otros agonistas generan finalmente el tromboxano A₂, con poder vasoconstrictor. Esto coincide con la agregación de más plaquetas libres sobre el agregado plaquetar, una fase que requiere la glicoproteína IIb/IIIa, que es el principal receptor del fibrinógeno y también del vWF (Ruggeri 2003). Al mismo tiempo la membrana de la superficie plaquetaria sufre cambios, incrementando la proporción de fosfolípidos cargados negativamente (especialmente fosfatidilserina) promoviendo de esta manera la unión de los complejos FX-asa (*tenase*), formado por el factor VIII activado (FVIIIa) y el factor IX activado (IXa) y protrombinasa, formado por el factor X activado (FXa) y el factor V activado (FVa) de la coagulación (Spronk 2003). De esta manera, permite la generación de la trombina (IIa), la cual por si misma es una potente promotora de la agregación y de la liberación plaquetaria. Se ha descrito la contribución de

las plaquetas a la vía intrínseca de manera, que hacen de soporte para los complejos *tenase* y protrombinasa, y los protege de la inactivación por parte de la AT.

1.4 - Sistema extrínseco

La principal vía de la coagulación sanguínea *in vivo* en respuesta a una lesión, es el sistema de la vía extrínseca (Spronk *et al.*, 2003), en el cual el TF es el iniciador primario de la coagulación sanguínea (Mackman 2004). El TF es una proteína integral de membrana que no está estructuralmente relacionada con el resto de las proteínas de la coagulación. De esta manera, el TF permanece localizado en la membrana celular en la cual es sintetizado. Cuando se produce una lesión en la pared del vaso sanguíneo esta permite la exposición del TF a la sangre. Entonces el factor VII (FVII), una proteína del grupo de las serinproteasas vitamino-K dependientes, se une al TF y se activa rápidamente (FVIIa). El complejo FVIIa/TF es capaz de activar el factor X (FX) y el factor IX (FIX) pasando a FXa y FIXa respectivamente (Mackman 2004). El FXa es inhibido por el TFPI (Broze 1995) o por la AT, si la exposición de TF no es masiva. Sin embargo, el FXa que permanece en la superficie celular puede combinarse con el FVa para llegar a producir pequeñas cantidades de trombina, la cual juega un papel muy importante en la activación plaquetaria (como hemos visto en el apartado anterior). También se activan otros factores (FVa, FVIIIa, FXIa) que van a ser necesarios en las reacciones de la coagulación (figura 1). Pequeñas cantidades de trombina generadas o residuales, amplifican la señal de inicio procoagulante al potenciar la adhesión plaquetar, la activación de las plaquetas y la activación de los factores FV, FVIII y FXI (Spronk *et al.*, 2003).

1.5- Sistema intrínseco

La vía intrínseca (fase de contacto) es un mecanismo alternativo de activación del sistema de coagulación. Están implicados el FXII, el kininógeno de elevado peso molecular (HMWK) y la precalicreína como cofactores. La activación del FXII (FXIIa) produce la activación del FXI (FXIa), el FXIa activa al FIX (FIXa) convergiendo de esta manera en la vía del factor tisular o sistema extrínseco (figura 1) (Spronk 2003).

La función fisiológica de esta vía no esta completamente aclarada, debido a que no es importante en la coagulación iniciada por una lesión. Las deficiencias de proteínas de este sistema no están asociadas a problemas hemorrágicos, excepto en el caso del déficit

del FXI, el cual su defecto produce problemas de sangrado moderado (O'Connell 2004). También se han descrito estudios que sugieren que los niveles elevados de FXIa podrían estar asociados a un incremento de riesgo a padecer trombosis arterial (Minnena *et al.*, 2000). Recientemente, se ha postulado la posible asociación de la deficiencia del FXII con la trombosis venosa, que podría explicarse por el papel que tiene el FXII en el sistema fibrinolítico produciendo una disminución de la actividad fibrinolítica en estos pacientes (Levi *et al.*, 1991).

1.6- Vía común

La vía común de la cascada de la coagulación (figura 1) se inicia por la activación del FX mediante el FIXa que es capaz de catalizar la conversión del FX a FXa en presencia de su cofactor, el FVIIIa, de fosfolípidos y de iones Ca^{2+} (formando el complejo *tenase*: FVIIIa/FIXa). De manera similar, el FXa y el FVa forman el complejo protrombinasa sobre una superficie fosfolípídica en presencia de iones Ca^{2+} . Este complejo cataliza la reacción de la protrombina (FII) a su forma activa, la trombina (FIIa) (Dahlbäck 2000). El FVIII se encuentra en la sangre formando un complejo no covalente con el vWF, que estabiliza su actividad coagulante y le ayuda así a localizarlo en los lugares de adhesión plaquetaria.

La fase final de la cascada de la coagulación es la formación de trombina, la cual convierte el fibrinógeno, una proteína soluble, en fibrina que polimeriza formando una malla, el trombo (figura 1). El fibrinógeno está formado por tres parejas de cadenas polipeptídicas (α , β , y γ), unidas por puentes disulfuro. La trombina hidroliza la molécula de fibrinógeno en las cadenas α y β liberándose los monómeros de fibrina al lisar los fibrinopéptidos A y B (FPA, FPB). De esta manera, se forman los monómeros de fibrina y la formación espontánea de polímeros de fibrina, inicialmente unidos por interacciones no covalentes que pasan a covalentes por acción del factor XIII (FXIII) o factor estabilizante de la fibrina. El FXIII es activado (FXIIIa) por la trombina, y produce la formación de uniones covalentes del coágulo de fibrina que incrementa su resistencia química, mecánica y a la fibrinólisis (Ariëns *et al.*, 2000). El resultado final del proceso es una malla de fibrina hemostática y relativamente estable. En toda esta fase final de la coagulación (Spronk *et al.*, 2003) existen una serie de activaciones por retroalimentación positiva, tales como el de la trombina sobre el FXI, el FV y el FVIII (figura 1).

1.7- Fibrinólisis

La fibrinólisis es el mecanismo mediante el cual se produce la lisis de la fibrina del trombo una vez cumplido su función hemostática, en un proceso relativamente análogo al de la coagulación. Después de una serie de transformaciones de precursores inactivos (zimógenos) a enzimas activos en presencia de cofactores y sobre la superficie celular, se convierte el plasminógeno en plasmina, la cual puede hidrolizar el trombo de fibrina solubilizándolo (Preissner 2004). En cada fase, una serie de proteasas inhibitoras limita estas reacciones y el hecho de que sucedan en la superficie celular, permite una regulación al nivel de unión de receptores y de la participación de la membrana celular. Durante la fase inicial de la coagulación, las plaquetas y las células endoteliales liberan el inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1) facilitando la formación de fibrina. Sin embargo, en respuesta a una serie de estímulos, las células endoteliales liberan el activador tisular del plasminógeno (t-PA) que junto al activador del plasminógeno tipo urokinasa (UK), tiene la capacidad de convertir el plasminógeno en su forma activa, la plasmina (Lijnen *et al.*, 1982). Al igual que en la coagulación la trombina activa el FV (retroalimentación positiva) acelerando la formación del FXa, en el proceso de la fibrinólisis, la plasmina también ejerce una retroalimentación positiva mediante la ruptura de un péptido de activación del plasminógeno que tiene mayor afinidad por la fibrina. Durante la fibrinoformación, el plasminógeno se une a la fibrina mediante las zonas de alta afinidad (lugares de unión de lisina) y se incorpora al trombo y cuando pasa a su forma activa, la plasmina, hidroliza la fibrina en diferentes fragmentos solubles. Además de hidrolizar la fibrina, la plasmina es capaz de hidrolizar otras proteínas de la coagulación, incluyendo el fibrinógeno.

En la regulación del sistema fibrinolítico intervienen una serie de inhibidores; por un lado el PAI-1 que inhibe al t-PA y por otro la α_2 -antiplasmina que inhibe el efecto proteolítico de la plasmina (Preissner 2004). Estos procesos de inhibición son específicos, de manera que cuando la plasmina se encuentra ligada a la fibrina está protegida de la inhibición por la α_2 -antiplasmina, pero cuando la plasmina se genera libre en plasma se inactiva rápidamente. Por otro lado, el t-PA cuando está unido a las células endoteliales está protegido de la inhibición del PAI-1. Además, la trombina protege los trombos de la fibrinólisis al aumentar la liberación de PAI-1 endotelial y al activar una carboxipeptidasa plasmática, el TAFI (inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina) que es capaz de

inhibir la fibrinólisis. La activación del TAFI promueve la estabilización de la malla de fibrina y en consecuencia de la formación del trombo de fibrina persistente. El TAFI actúa mediante la lisis de residuos lisina C-terminal de la fibrina, previniendo la unión del plasminógeno, la plasmina, o el t-PA a la fibrina e inhibiendo secundariamente la fibrinólisis (Bazjar 2000).

1.8- Inhibición de la coagulación.

La regulación de la coagulación tiene lugar a diferentes niveles y se lleva a cabo por diferentes enzimas inhibidores o por modulación de la actividad de los diferentes cofactores:

- **TFPI** (inhibidor de la vía del factor tisular): inhibe el complejo (figura 2) entre el FVIIa y el TF (Broze 1995). Este inhibidor, cuando se asocia a las células endoteliales, se encuentra principalmente unido a lipoproteínas en sangre o a heparán sulfato y entre un 5-10% circula en forma libre. La actividad anticoagulante del TFPI se desarrolla en 2 etapas: primero forma un complejo reversible estequiométrico 1:1 con el FXa produciendo la pérdida de su actividad catalítica. En la segunda etapa, el complejo FXa-TFPI se une al complejo FVIIa-TF unido a la membrana en una reacción que necesita iones Ca^{2+} formándose el complejo cuaternario FXa-TFPI-FVIIa-TF inhibiendo de esta manera el complejo FVIIa-TF (figura 2).

- **Antitrombina (AT)**: la AT (figura 2) que actúa como inhibidor de la trombina y el FXa, pero también inhibe el FIXa, el FXIa y el FXIIa (van Boven 1997). La AT es por sí misma un inhibidor de baja potencia, pero incrementa su velocidad inhibitoria unas 1000 veces en presencia de heparina (anticoagulante). La heparina tiene su equivalente *in vivo*, en el proteoglicano sulfato de heparán presente en el endotelio vascular. La molécula de AT se une a la molécula de heparina a través de una secuencia discontinua de residuos básicos (Lys, Arg) en la zona aminoterminal. La trombina se une también a la cadena de heparina de una manera no específica mediante cargas electrostáticas. De esta manera se forman complejos ternarios de heparina-AT-trombina en los que el sitio activo de la trombina se acerca al sitio reactivo de la AT. El FXa y otros factores activados de la coagulación se unen de manera débil a la heparina y son inhibidos por el complejo heparina-antitrombina gracias al cambio conformacional que induce la heparina en la molécula de antitrombina.

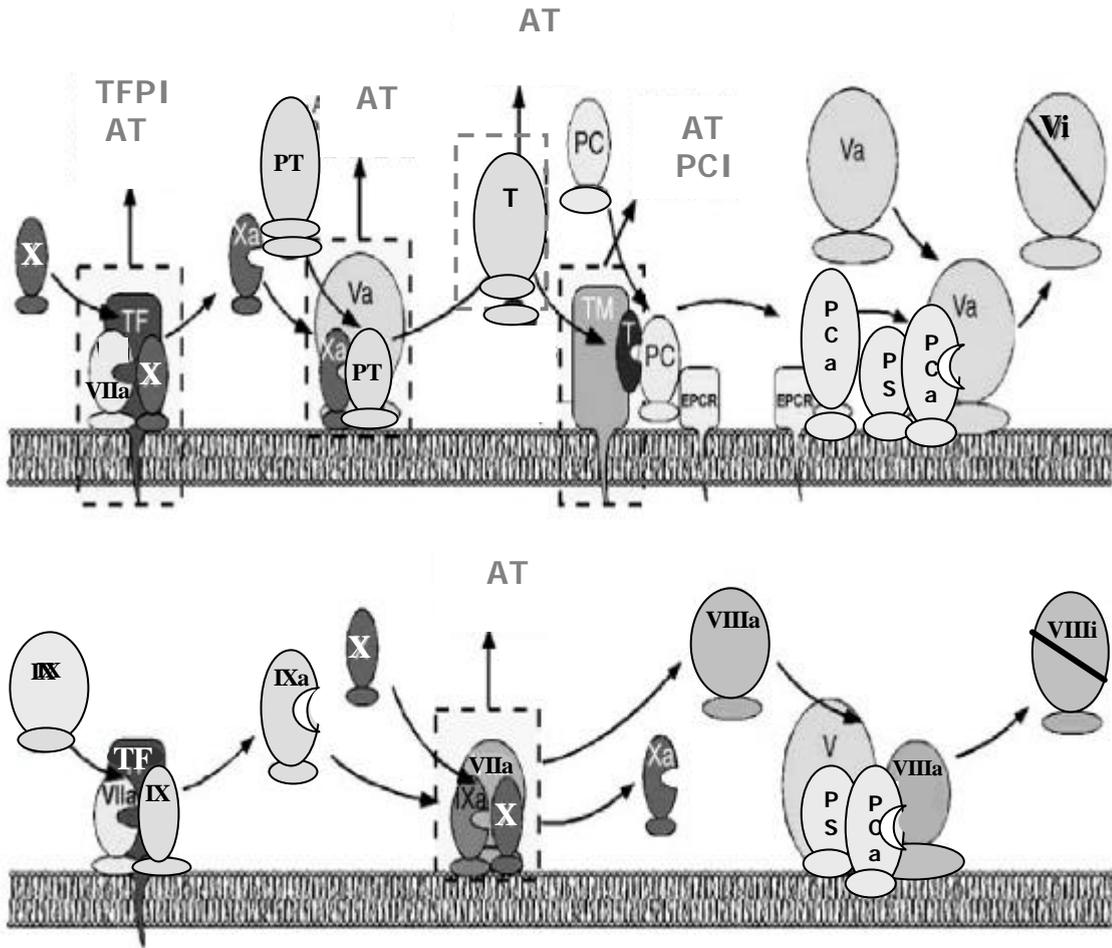
Fisiológicamente la AT muestra una inhibición más eficaz sobre los enzimas en sus formas libres. Cuando los enzimas están formando parte de los complejos *tenase* o protrombinasa muestra menos eficacia en su inhibición. De esta manera limita el proceso de la coagulación en los lugares de lesión vascular y protegiendo la circulación de enzimas libres (van Boven 1997). Debido a ello, cuando la trombina se encuentra unida a la malla de fibrina, ésta es resistente a la AT.

- **Sistema anticoagulante de la proteína C (PC).** El sistema de la PC regula la coagulación mediante la modulación de la actividad de dos cofactores: el FVIIIa y el FVa (Dahlbäck 1995). La PC es un zimógeno de una enzima tipo serinproteasa, vitamino-K dependiente, con propiedades anticoagulantes, que se activa sobre la superficie de células endoteliales mediante el complejo formado por la trombina y la trombomodulina. Este proceso es potenciado cuando la PC se encuentra unida al receptor endotelial de la PC (EPCR). Cuando se forma el complejo trombina-trombomodulina, la trombina pierde sus características procoagulantes y se transforma en un enzima con propiedades anticoagulantes ya que es capaz de activar la PC a PC activada (PCa). La PCa tiene como cofactor en su actividad inhibitoria a la PS. La PS es también una proteína del grupo vitamino-K dependiente, que en un 40% circula libre y es la que posee actividad como cofactor, mientras que el 60% restante está unida a la glicoproteína transportadora de la subunidad C4b del complemento (*C4b-binding protein*, C4b-BP) y no participa como cofactor en la actividad anticoagulante (Dahlbäck 1995).

La PCa y la PS libre forman un complejo unido a la membrana, el cual hidroliza los FVa y FVIIIa (figura 2), incluso cuando forman parte de los complejos *tenase* y protrombinasa, inactivando así la función de cofactor que ejercen sobre los FXa y FIXa e inhibiendo de esta manera la generación de trombina. El propio FV actúa como cofactor de la PCa, junto con la PS, en la degradación de FVIIIa.

La inhibición de la actividad proteolítica de la PCa se lleva a cabo por tres enzimas de la familia de las serpinas: el inhibidor de la PC (PCI), el PAI-1 y la α_1 -antitripsina (Rezaie 2003).

Figura 2. En esta figura se muestran los diferentes sistemas inhibidores de la coagulación: AT, PC y TFPI, PCI. Los factores de la coagulación están mostrados en números romanos y con una “a” se indica sus formas activas y con una “i” sus formas inactivas. T: trombina; PT: protrombina; TM: trombomodulina; EPCR: receptor de membrana de la PC. (Esquema según *Esmon 2003*).



2.- Trombofilia

2.1- La trombofilia hereditaria

La trombosis tiene un papel crucial en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares y es el principal responsable del desenlace fatal del infarto agudo de miocardio, los accidentes cerebrovasculares tromboembólicos y el tromboembolismo venoso (Jandl 1996; Goldhaber 1994).

Se define la trombofilia como la tendencia a desarrollar trombos en las venas o en las arterias. La trombosis arterial o venosa son buenos ejemplos de enfermedad compleja, ya que contribuyen en el riesgo de llegar a desarrollar la enfermedad múltiples vías biológicas (presión arterial, fluidez sanguínea, coagulación, inflamación o aterogénesis).

El concepto de trombofilia se utiliza más frecuentemente en el contexto de la enfermedad tromboembólica venosa, para describir la susceptibilidad genética a padecer dicho tromboembolismo venoso. En estos pacientes la aparición del accidente trombótico sucede ya en la juventud, suele haber historia trombótica familiar, con trombosis recurrentes, en localizaciones inusuales o presentan una severidad desproporcionada al estímulo causal (Lane *et al.*, 1996). La presencia de un factor hereditario predispone hacia la clínica trombótica, sin embargo, para llegar a desarrollar la enfermedad, en ocasiones se requiere la interacción con otros factores genéticos o ambientales (figura 3) (Rosendaal 1999).

No fue hasta 1965 cuando se reconoció que la trombosis podría ser una enfermedad heredable. Egerberg (Egerberg 1965) describió una familia con trombofilia asociada a una deficiencia de AT ya que se demostró la cosegregación entre una deficiencia congénita de AT y la tendencia trombótica familiar. Esta asociación parecía demostrar la hipótesis defendida por Astrup en 1958 de la existencia de un balance trombohemorrágico (Astrup, 1958), donde postulaba la existencia de un equilibrio finamente regulado entre la formación del trombo y su disolución y por tanto cambios en estas condiciones podrían decantar el equilibrio hacia la formación de un trombo o hacia el sangrado. Desde entonces, han sido estudiadas muchas deficiencias de factores de la coagulación y del sistema fibrinolítico para determinar su posible papel en la trombofilia hereditaria (tabla 1). Así las deficiencia de la PC y la deficiencia de la PS fueron asociadas a la trombofilia familiar en los años ochenta (Griffin *et al.*, 1981; Comp y Esmon 1984).

Los resultados de los diferentes estudios sistemáticos realizados de estas alteraciones de la coagulación (deficiencias de AT, de PC y de PS), dieron como resultado el conocimiento de las dos principales vías anticoagulantes endógenas: la vía de la AT y la vía del sistema PC/PS (ver apartado 1.8). Sin embargo, estos defectos genéticos asociados a la trombosis se encontraban sólo en un pequeño porcentaje (entre el 10-15%) de todas las familias que habían sufrido tromboembolismo venoso, identificadas a través de un paciente sintomático (Heyboer *et al.*, 1990; Malm *et al.*, 1992, Mateo *et al.*, 1997). El desconocimiento de la causa asociada a la enfermedad tromboembólica en el 85-90% restante de los pacientes con trombosis, estimulaba a la investigación de otros posibles mecanismos. Además, como el modelo de herencia que seguían estos factores de riesgo (AT, PC y PS) era autosómico dominante, se pensó que la trombofilia familiar estaba causada por un defecto genético dominante con una penetrancia reducida. Esto explicaría la variabilidad de la expresión clínica de la enfermedad (Lane *et al.*, 1996).

La idea de la trombofilia familiar como una enfermedad monogénica (con un modelo de herencia mendeliana simple) quedó en entredicho mediante el estudio sistemático de familias con deficiencia de proteína C (Miletich *et al.*, 1993). En estos estudios tres observaciones contradicen la hipótesis de un modelo de herencia dominante para la trombosis: 1) en familias con pacientes homocigotos para una deficiencia de PC, los cuales sufren una clínica trombótica severa, muy pocos de sus familiares portadores heterocigotos de la deficiencia sufren episodios trombóticos (Broekmans *et al.*, 1988). 2) la prevalencia de heterocigotos para una deficiencia de PC en la población sana es del 0,2 al 0,5%; ni estos individuos ni sus familiares portadores heterocigotos de la deficiencia de PC experimentan episodios trombóticos (portadores asintomáticos) (Miletich *et al.*, 1993, Tait *et al.*, 1995). 3) en familias con trombofilia portadoras de una deficiencia de PC, alrededor del 45% de los familiares heterocigotos para la deficiencia han sufrido trombosis, es decir, que el 55% restante de los portadores del déficit son asintomáticos. Además, alrededor del 8% de los miembros no portadores de la deficiencia también han sufrido episodios trombóticos, indicando una reducida penetrancia y una alta frecuencia de fenocopias (individuos que expresan la enfermedad sin ser portadores del rasgo analizado, en este caso la deficiencia de PC). Algo similar ocurre en familias con trombofilia portadoras de una deficiencia de PS, en las que el 45 % de los familiares afectados del déficit permanecen asintomáticos.

Como resultado de estas observaciones se hipotetizó que la trombofilia familiar podría estar causada por la cosegregación de uno o más factores genéticos que incrementarían el riesgo trombótico (Miletich *et al.*, 1993). Esta hipótesis se confirmó después del descubrimiento en 1993 del fenotipo RPCa, como el factor de riesgo trombótico más frecuente en la población general (Dahlbäck *et al.*, 1993; Dahlbäck 1994; Vooberg *et al.*, 1994). En 1994 se identificó la mutación factor V Leiden (FVL) (Bertina *et al.*, 1994) como la responsable del 80-90% de los casos de RPCa. Esta mutación produce la sustitución del aminoácido Arginina por Glutamina en la posición 506 (R506Q) debido a la mutación G1691A en del exón 10 del gen del FV. La alta prevalencia de esta mutación en la población general, entre un 2-5% (Rees *et al.*, 1995; Zivelin *et al.*, 1997), la convierte en una buena candidata como posible factor de riesgo trombótico adicional en las familias portadoras de deficiencias de PC o de PS, y los estudios posteriores así lo demuestran, ya que los pacientes portadores del FVL en combinación con alguna de estas deficiencias muestran un riesgo más elevado de sufrir accidentes trombóticos que los portadores de una sola de las deficiencias (Koeleman *et al.*, 1994; Zöller *et al.*, 1995).

Desde entonces, cambió radicalmente el conocimiento de la patogénesis de la trombosis venosa. Actualmente, se considera a la trombofilia hereditaria como una enfermedad multifactorial, donde están implicados múltiples factores genéticos y ambientales (figura 3), y compleja, porque la interacción de múltiples genes (cada uno de ellos con un efecto variable) con el ambiente, determinarán en cada individuo el grado de susceptibilidad a la trombosis (Majerus 1994; Rosendaal 1999; Bovill *et al.*, 1999; Lane y Grant 2000).

Algunos de los factores de riesgo adquiridos implicados en la trombosis venosa se muestran en la tabla 1 (Nachman y Silverstein 1993). Tal como se ha descrito uno o más de estos factores de riesgo adquiridos están presentes en un 33% de los pacientes en el primer evento de trombosis venosa (Bertina 2001).

Los conocimientos sobre los componentes genéticos de la trombosis venosa son escasos (Lane y Grant 2000), más si se tiene en cuenta que la heredabilidad (proporción de la variancia del fenotipo que es debida al efecto de los genes) de la trombosis es del 60% (Souto *et al.*, 2000a). Los factores genéticos de riesgo trombótico conocidos sólo se identifican, en el mejor de los casos y dependiendo de la población estudiada, en el 60% de las familias con trombosis hereditaria (Mateo *et al.*, 1998). El gran reto en la actualidad es

la identificación de los factores genéticos de riesgo trombótico en el 40% de las familias restante, portadoras de trombofilia inexplicada o idiopática, ya que no presentan ninguno de los factores biológicos conocidos asociados a enfermedad tromboembólica.

En medicina es habitual entender la enfermedad como una variable discreta, dicotómica, con dos posibles estados: individuos sanos y enfermos. Sin embargo la genética de enfermedades complejas permite interpretar la predisposición o susceptibilidad de cada individuo a padecer una enfermedad como una variable continua de riesgo. Esta variable es un fenotipo complejo, no observable ni mensurable directamente, pero deducible mediante modelos matemáticos. El conjunto de genes responsables y todas sus interacciones determinan la susceptibilidad genética a la enfermedad para cada individuo. Aquellos sujetos que sobrepasan un determinado umbral de este gradiente, manifiestan clínicamente la enfermedad. De ahí el nombre de “modelos umbral” para explicar el riesgo a padecer una enfermedad compleja (Falconer y Mackay 1996). En otras palabras, lo que está regulado genéticamente no es la enfermedad en sí misma sino la mayor o menor predisposición a padecerla.

En la trombosis venosa como enfermedad multifactorial, existen variaciones de la expresión del fenotipo clínico que pueden ser explicadas por factores de riesgo adquiridos, tales como embarazo, puerperio, uso de anticonceptivos orales e inmovilización. Obviamente, cualquier circunstancia que pueda afectar a aquellos órganos donde los factores de la coagulación se sintetizan de manera natural podría afectar también a las concentraciones de estos factores (enfermedades hepáticas, disfunción endotelial etc.), así como la inclusión o no en la dieta de substratos y vitaminas (déficit de vitamina K). Existen muchos defectos que afectan a la concentración de factores de la coagulación de manera muy distinta (Balleisen *et al.*, 1985a; Balleisen *et al.*, 1985b), y por ello sería posible que por ejemplo altas concentraciones de protrombina y FVIII reflejen una mezcla de factores de riesgo genéticos y factores adquiridos. Los factores de riesgo adquiridos pueden contribuir a variaciones intra y interindividuales, lo cual podría explicar diferencias de riesgo entre individuos y en diferentes situaciones (Lowe *et al.*, 1997; Bloemenkamp *et al.*, 1998).

2.2- Trombosis venosa recurrente

Todos los pacientes con trombosis venosa, tanto si padecen o no una deficiencia hereditaria conocida, presentan un riesgo elevado de sufrir trombosis recurrente durante muchos años después del primer episodio. La trombosis recurrente es fatal en un 5% de los pacientes (Douketis *et al.*, 1998), y en un tercio de los pacientes, ha sido asociada con el síndrome post-trombótico (Pandroni *et al.*, 1996). La trombosis venosa recurrente requiere terapia prolongada con tratamiento anticoagulante, lo cual por si mismo conlleva un riesgo de hemorragia importante. La recurrencia es más frecuente en hombre, de edad avanzada, en pacientes sometidos a inmovilización, pacientes con cáncer, y en pacientes que ya han tenido anteriormente trombosis recurrente. La trombosis recurrente es más frecuente en pacientes con déficit de AT, PC, PS (van den Belt *et al.*, 1997); en aquellos con más de un defecto (Makris *et al.*, 1997) y en individuos portadores homocigotos para el FVL (Emmerich *et al.*, 1997). En individuos que son heterocigotos para el FVL o para la mutación PT20210A los resultados son controvertidos hasta el momento (Lensing y Prins 1999).

Figura 3. La trombosis venosa como enfermedad compleja puede ser debida a la interacción de factores de riesgo genéticos y ambientales.

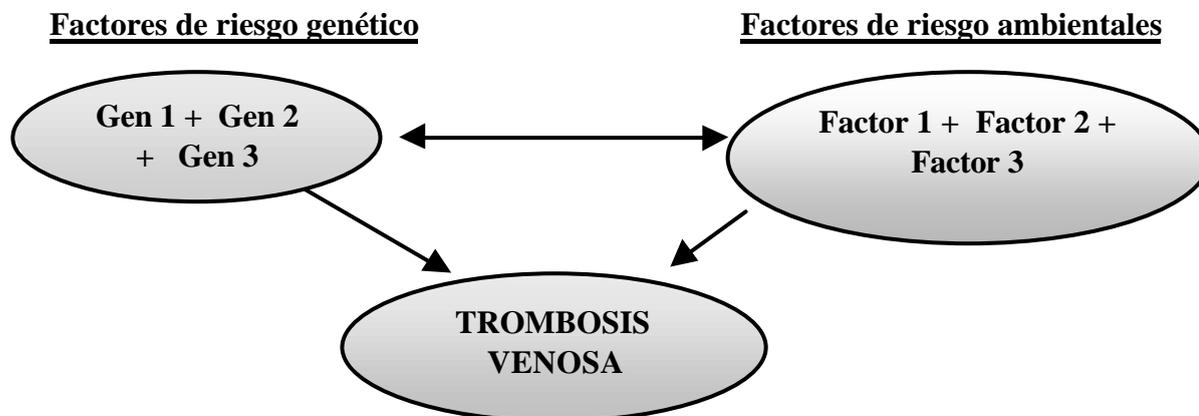


Tabla 1. Causas de trombosis venosa congénitas y adquiridas.

Factores de riesgo genéticos

Deficiencia de AT	Deficiencia de PC
Deficiencia de PS	RPCa
FVL	PT20210A
<i>Locus</i> del grupo sanguíneo del sistema ABO	

Factores con regulación genética y ambiental

Niveles elevados de FVIII, FIX, FXI

Factores de riesgo adquiridos

Cirugía y traumatismo	Inmovilización prolongada
Edad avanzada	Cáncer
Trombosis previas	Embarazo y puerperio
Uso de anticonceptivos orales	APA
Terapia hormonal substitutiva	RPCa adquirida
Hiperhomocisteinemia	

2.3- Bases moleculares de la trombofilia hereditaria

2.3.1- Deficiencia de antitrombina

La AT es una glicoproteína que se sintetiza en el hígado y que pertenece a la familia de inhibidores de serinproteasas (serpinas). La AT es el inhibidor principal de la trombina y es por ello uno de los principales reguladores fisiológicos de la formación de fibrina (ver apartado 1.8). El gen que codifica para la AT está localizado en el cromosoma 1 entre las bandas 1q23 y 1q25 (Bock *et al.*, 1985), tiene 13,5 kilobases de longitud y consta de siete exones (Bock *et al.*, 1988). Se han descrito muchas variaciones de la secuencia o polimorfismos en el gen de la AT (Lane *et al.*, 1993; Blajchman *et al.*, 1992) incluyendo una secuencia repetitiva de 3 nucleótidos muy polimórfica en el intrón 4.

La deficiencia en AT es una enfermedad heterogénea que sigue un patrón de herencia autosómica dominante y fue inicialmente reportada por Egeberg en 1965 (Egerberg 1965). La subclasificación de la deficiencia de AT está basada principalmente en los resultados funcionales y inmunológicos analizados en plasma. Más tarde, y debido a la información más amplia al conocer las mutaciones presentes en el gen de la AT se modificó la nomenclatura (Lane *et al.*, 1993) que es la siguiente:

- Deficiencia de AT Tipo I, caracterizada por una disminución de AT funcional e inmunológica.
- Deficiencia de AT Tipo II, caracterizada por un déficit funcional (Lane *et al.*, 1997). El tipo II se divide en 3 subtipos: RS, una variante de la molécula de AT, la cual tiene un defecto en el centro activo (II RS: *Reactive Site*); HBS, un defecto que afecta al lugar de unión de la heparina (II HBS: *Heparin Binding Site*) y PE déficit funcional múltiple (efecto pleiotrópico II PE).

La prevalencia de esta deficiencia en la población general se ha estimado en un 0,02% (Tait *et al.*, 1994; Colan *et al.*, 1994), pero en pacientes con trombofilia hereditaria es entre 1-3% (tabla 2). En población española se observó como resultado del estudio multicéntrico español coordinado por nuestra Unidad (estudio EMET: Estudio Multicéntrico Español de Trombofilia) que en pacientes con trombosis venosa la prevalencia era de un 0,47% (Mateo *et al.*, 1997). Se ha estimado que la deficiencia de AT está asociada a un incremento de entre 10 y 20 veces el riesgo trombótico (Lane *et al.*, 1996). Las manifestaciones clínicas son parecidas a las que se producen en las deficiencias de PC y PS (ver apartados 2.3.2 y 2.3.3) pero la deficiencia en AT está menos asociada a la

trombosis venosa superficial. También se han descrito deficiencia de AT asociada a episodios de trombosis arterial (Lane *et al.*, 1993).

2.3.2- Deficiencia de Proteína C

La proteína C (PC) es una glicoproteína plasmática vitamino-K dependiente precursora de la PCa, que se sintetiza en el hígado como una molécula de cadena sencilla. La PC de cadena sencilla se convierte en una molécula de 2 cadenas después de la eliminación de un dipéptido (Arg157-Thr158). En el plasma la PC se encuentra en su mayoría en forma de doble cadena, compuesta por una cadena pesada de 41 kDa y una cadena ligera de 21 kDa.

Una de las principales funciones de la PCa (Esmon, 1992), es su función anticoagulante que actúa inactivando los cofactores FVa y FVIIIa, por roturas proteolíticas selectivas (ver apartado 1.8 y figura 2).

El ADNc humano de la PC ha sido clonado y secuenciado (Foster y Davie 1984). La estructura del gen, que recibe el nombre de *PROC*, (Foster *et al.*, 1985) contiene 9 exones y 8 intrones con un total de 11 kb de ADN genómico. Se han descrito varios polimorfismos en el gen *PROC*, localizados en la zona promotora y en la región que codifica para la proteína (Reitsma *et al.*, 1995).

Recientemente, y como parte de los resultados del proyecto GAIT, se ha descrito cómo la variabilidad de los valores plasmáticos de la PC vienen determinados por el efecto de otros genes aparte del gen estructural *PROC*. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de un nuevo QTL en el cromosoma 16, que influye en la variabilidad de los niveles normales de PC plasmáticos (Buil *et al.*, 2004).

La deficiencia en PC es una enfermedad heterogénea (Reitsma *et al.*, 1995), y se clasifica según:

- Deficiencia de PC tipo I: que se caracteriza por una reducción de los niveles antigénicos y funcionales de la molécula.
- Deficiencia de PC tipo II: existe una molécula anormal de PC dando lugar a niveles funcionales reducidos de PC con niveles antigénicos normales.

En mayo de 1995, se publicó la primera base de datos de mutaciones del gen *PROC* (Reitsma *et al.*, 1995) que consta de 160 mutaciones diferentes asociadas a deficiencias tipo I y II. Un 60 % de las mutaciones descritas que causan la deficiencia tipo I de PC y de

tipo II, son mutaciones no sinónimas (*missense*), donde la sustitución de una base produce un codón nuevo que codifica un aminoácido diferente. Estas mutaciones se localizan en exones, que codifican para regiones de la proteína que se encuentran en la superficie, en las áreas accesibles y zonas solubles que son relevantes para su función (unión del calcio, activación, interacción con la trombomodulina, centro activo o unión del substrato) (Greengard *et al.*, 1994). Además en algunos caso de deficiencias tipo I, se han localizado pequeñas deleciones e inserciones que producen mutaciones sin sentido (*nonsense*) dando lugar a una terminación de la traducción de la proteína prematura (stop codon).

El análisis genético del gen *PROC* pone en evidencia que las mutaciones que se han descrito, no siempre dan lugar a una alteración con repercusión clínica. La deficiencia de la PC en forma heterocigota se ha estimado en un 2 a 5% en pacientes con trombosis y en un 0,3-0,5% en población control. La prevalencia en nuestro medio en pacientes con trombosis venosa se estimó de un 3,19% en el Estudio EMET (Mateo *et al.*, 1997). Además se ha descrito que incrementa el riesgo de trombosis hasta 10 veces (Aiach *et al.*, 1997). La prevalencia de la deficiencia hereditaria tipo I de PC se ha estimado entre el 1 y el 9% en pacientes con trombofilia, y entre el 12 y el 18% en pacientes seleccionados con trombosis a edad joven, trombosis recurrente o historia familiar de trombosis (Miletich *et al.*, 1987). La deficiencia de PC en forma homocigota o doble heterocigota es una situación muy poco frecuente y se asocia a una coagulopatía neonatal muy grave que cursa con *purpura fulminans*: lesiones en la piel, ceguera, coagulación intravascular diseminada y un potencial daño cerebral irreversible (Dhainaut *et al.*, 2004).

En las familias con deficiencia en PC alrededor del 70 al 80% de los pacientes sufren el primer episodio trombótico a una edad media de 29 a 45 años (Broekmans *et al.*, 1988, Mateo *et al.*, 1997). El 60-70% de los pacientes heterocigotos habían sufrido una trombosis venosa previamente al diagnóstico. De los datos del estudio de las familias trombofílicas identificadas a partir del estudio EMET de trombosis venosa en población española, obtuvimos como resultado que el riesgo de trombosis en los familiares afectos muestra un OR:12,6 para el déficit de proteína C (Mateo *et al.*, 1998). La manifestación clínica más común asociada a esta deficiencia es la TVP en las extremidades inferiores. Otras manifestaciones clínicas frecuentes son el tromboembolismo pulmonar y la tromboflebitis superficial. Menos frecuentes son la trombosis venosa cerebral y trombosis del eje esplenoportal, mesentéricas o renales (Broekmans *et al.*, 1988). También se ha

publicado que entre el 6 y 8% de los pacientes con deficiencia en PC desarrollan trombosis arteriales, pero siempre después de los 40 años y en la mayoría de los casos siendo precedida de trombosis venosa (Broekmans *et al.*, 1988).

Los niños recién nacidos con niveles indetectables de PC en plasma desarrollan *purpura fulminans*, mientras que, cuando los niveles de PC en plasma son bajos, pero detectables pueden presentarse trombosis venosas en la adolescencia o incluso antes (Marlar *et al.*, 1989).

2.3.3- Deficiencia de Proteína S

La PS es una glicoproteína vitamina K dependiente, que se sintetiza principalmente en el hígado, pero también en las células endoteliales, en los megacariocitos y en las células testiculares de Leydig. La PS actúa de cofactor de la PCa, en presencia de fosfolípidos e iones de calcio, en la inactivación de los factores FVa y FVIIIa (Koedam *et al.*, 1988), probablemente para facilitar la formación de un complejo sustrato-enzima sobre la superficie de membranas de fosfolipídicas plaquetarias. La PS desempeña pues, un papel anticoagulante (ver apartado 1.8) y su deficiencia conduce a una predisposición a padecer trombosis venosa (Broekmans *et al.*, 1985).

En sangre, un 40% de la PS circula en forma libre y un 60% formando un complejo estequiométrico 1:1 con el C4b-BP (60%). Solamente la forma libre de la PS funciona como cofactor de la PCa. La PS por si misma tiene actividad anticoagulante inhibiendo el complejo *tenase* (FIXa-FVIIIa) y el complejo protrombinasa (FXa-FVa) y algunas de estas reacciones son independientes de la presencia de C4b-BP (Koppelman *et al.*, 1995).

El ADNc de la PS humana ha sido aislado y secuenciado (Hoskins *et al.*, 1987) y, a partir de su secuencia, se ha extrapolado la secuencia de aminoácidos de la PS humana. El tamaño del mRNA es aproximadamente de 3,5 a 4,0 kb, incluyendo 2 señales de poliadenilación en el extremo 3' terminal. Se han identificado y secuenciado dos genes altamente homólogos para la PS en el cromosoma 3 (Ploos van Amstel *et al.*, 1990), el gen que codifica la PS, el *PROS* o *PSa* que es el gen activo (contiene 15 exones) (Watkins *et al.*, 1988) y un pseudogen, el *PSβ*, que tiene una longitud de 55 kb y una homología con el *PSa* del 97% en la secuencia de los exones. Sin embargo, *PSβ* no se transcribe al carecer de exón 1 y contener una larga variedad de mutaciones en su secuencia, incluyendo tres

mutaciones de parada de síntesis proteica. Este pseudogen ha sido localizado a unos 4cM del gen *PROS* (Ploos van Amstel *et al.*, 1989).

La primera familia con deficiencia hereditaria en PS asociada a la enfermedad tromboembólica fue publicada por Schwarz en 1984 (Schwarz *et al.*, 1984). Desde entonces se han sido descrito numerosos casos (Comp y Esmon 1984). La prevalencia de deficiencia en PS en individuos sanos es desconocida, pero puede estimarse entre el 0,03 y el 0,13% (tabla 2), mientras que en pacientes con historia trombótica ha sido estimada entre el 0,5-8% (Lane *et al.*, 1996) (tabla 2). En el estudio EMET, realizado en población española, observamos una prevalencia de la deficiencia de PS en pacientes con trombosis venosa del 7,27% (Mateo *et al.*, 1997) y en el estudio familiar, a partir de este estudio EMET, observamos que los pacientes con deficiencia de PS tipo III tenían 8,1 veces más riesgo de padecer trombosis venosa que los individuos normales (Mateo *et al.*, 1998).

El riesgo de episodios trombóticos en pacientes con edad joven y con déficit de PS es inferior al de la deficiencia de AT, igualándose en edad avanzada (Rosendaal 1999). Las manifestaciones clínicas son parecidas a las que se producen en las deficiencias de PC y AT, aunque la presencia de trombosis arterial y cerebral son más frecuentes (Allart *et al.*, 1990; Coller *et al.*, 1987). Sólo se han descrito unos pocos casos de deficiencia en homocigosis, y se han asociado a una enfermedad trombótica severa y a *purpura fulminans* neonatal (Mahasandana *et al.*, 1990).

Existen varias propuestas de subclasificación de la deficiencia de PS (Gandrille *et al.*, 1997; Comp 1990). Basándose en la cuantificación antigénica de PS total y PS libre y de la PS funcional en plasma, la deficiencia se clasifica como:

- Deficiencia de PS tipo I: donde los niveles de PS total, PS libre y PS funcional está reducidas.
- Deficiencia de PS Tipo II: los niveles antigénicos de PS libre y PS total son normales, pero la PS funcional tiene una actividad reducida.
- Deficiencia de PS Tipo III: los niveles de PS total antigénica son normales pero se encuentran niveles reducidos de PS libre antigénica y de PS funcional.

Se ha descrito que en una misma familia pueden coexistir 2 tipos de déficits (I y III) (Zöller *et al.*, 1995b), sugiriendo una base genética común. Se han identificado y recopilado en bases de datos tres tipos de mutaciones en los casos con deficiencia de PS (Gandrille *et al.*, 2000): las mutaciones que producen terminaciones de traducción de

proteína prematuras (*stop-codon*), las que causan cambio en la pauta de lectura y las grandes deleciones. La mayoría de estas mutaciones cosegregan en la familia y pueden ser responsables de la deficiencia, aunque no se ha probado funcionalmente. En el 50-60% de los pacientes con deficiencia hereditaria de PS estudiados no se encuentra ningún defecto genético (Gandrille *et al.* 1995). Este bajo porcentaje de detección podría ser debido a la existencia de alteraciones en otros genes que estén determinando los niveles de PS (Almasy *et al.*, 2003).

2.3.4- Resistencia a la PC activada (RPCa)

El fenotipo de la resistencia hereditaria a la PC activada (RPCa) fue descrito por (Dahlbäck *et al.*, 1993) y se caracteriza por una disminución a la acción anticoagulante del sistema de la PC. En Dinamarca, la prevalencia de RPCa fue estimada en el 21% de los pacientes que habían sufrido un episodio trombótico, sin ninguna selección previa (Koster *et al.*, 1993), y en alrededor del 50% en pacientes seleccionados con historia personal o familiar de trombosis (Dahlbäck *et al.*, 1993). En la población general, presuntamente sana, se ha estimado una prevalencia del 5% (Koster *et al.*, 1993). Estos datos son válidos para la población nórdica, pero parecen ser inferiores en las poblaciones mediterráneas (Simioni *et al.*, 1994).

2.3.4.1.- FV Arg506Gln (Factor V Leiden)

El FV es una glicoproteína de cadena sencilla que se sintetiza en el hígado y en los megacariocitos. En sangre circula como una glicoproteína de cadena sencilla. La organización de los dominios (A1-A2-B-A3-C1-C2) del FV es similar que la del FVIII (Jenny *et al.*, 1987). Mediante la activación proteolítica de la trombina, el dominio B se elimina, consiguiendo pasar a su forma activada (FVa), que esta formada por una cadena pesada (A1-A2) y una cadena ligera (A3-C1-C2) las cuales permanecen unidas mediante enlaces no covalentes e iones Ca^{2+} (Rosing y Tans 1997).

El FV en su forma activa (FVa) actúa como un cofactor del complejo protrombinasa (FXa, fosfolípidos y Ca^{2+}). Finalmente el FVa es inactivado por la degradación proteolítica de su cadena pesada mediante la PCa y esta inactivación es más eficiente en presencia de fosfolípidos y Ca^{2+} . En primer lugar, se inactiva al romper la unión en la Arg506 y seguidamente en la Arg306 y Arg679 (Kalafatis *et al.*, 1994). La

inactivación del FVa mediante la PCa y con la PS como cofactor de la reacción, es un paso importante de este sistema de inhibición de la coagulación (ver apartado 1.8).

En 1994, se identificó una mutación puntual en el gen *F5* como el defecto genético que causaba el fenotipo de la resistencia a la proteína C activada (RPCa) en la gran mayoría de los individuos afectados (Bertina *et al.*, 1994; Voorberg *et al.*, 1994). Se trata de una transición de G→A del nucleótido 1691 en el exón 10 del gen *F5*, que provoca un cambio del aminoácido 506 de arginina (Arg) a glutamina (Gln). Esta mutación se conoce como Factor V Leiden (FVL). Este cambio en uno de los lugares de inactivación del FVa produce una molécula de FVa que muestra una resistencia a la acción de la PCa, potenciando así la capacidad procoagulante del FV (figura 1).

Esta mutación esta presente entre un 2-5% en la población general presuntamente sana (Rees *et al.*, 1995), en un 20% en pacientes con trombosis venosa consecutivos no seleccionados y en un 50% en individuos seleccionados de familias con trombofilia inexplicada (Griffin *et al.*, 1993; Bertina *et al.*, 1994, Lane *et al.*, 1996). Esta prevalencia era 10 veces más alta que la de los demás factores de riesgo genéticos conocidos (deficiencias en PC, PS y AT) hasta ese momento y la convertían en la causa de trombofilia familiar más frecuente. Los datos disponibles en la actualidad estiman que la heterocigosidad para el FVL aumenta el riesgo de padecer trombosis entre 3 y 8 veces (Koster *et al.*, 1993) y que en estado homocigoto incrementa el riesgo entre 50 y 100 veces (Rosendaal *et al.*, 1995). Se ha descrito que un 10-20% de los casos con el fenotipo de RPCa no presentan la mutación FVL, por lo que se intuye la presencia de otros defectos genéticos subyacentes (Koster *et al.*, 1995).

Aunque aún no existe una casuística bien definida sobre la clínica asociada a la RPCa, la ausencia de trombosis en la mayoría de los heterocigotos y en algunos homocigotos para la mutación FVL indican que el riesgo trombótico asociado a la RPCa es inferior que el asociado a las deficiencias plasmáticas en PC, PS o AT. Sin embargo, cuando la RPCa está en combinación con alguna de ellas el riesgo trombótico es superior al asociado a estas deficiencias por separado (Koeleman *et al.*, 1994; Zöller *et al.*, 1995).

La localización de la trombosis venosa que presentan los portadores del FVL no se limita a las extremidades inferiores sino que también se presenta, en algunos casos, una trombosis venosa cerebral (Martinelli *et al.*, 1996). Además, hay evidencias que los

individuos portadores del FVL presentan una menor tendencia a padecer tromboembolismo pulmonar aislado (Desmarais *et al.*, 1996).

2.3.4.2- Otras mutaciones descritas en el gen del *F5* asociadas a la RPCa.

Como hemos explicado anteriormente, algunos pacientes muestran el fenotipo de la RPCa en ausencia de la mutación FVL, sin embargo se desconoce la prevalencia de estos casos. En 1998 se publicaron dos trabajos (Chan *et al.*, 1998; Williamsom *et al.*, 1998) que describían la presencia de dos mutaciones en el exón 7 gen *F5*, que implicaban otros lugares donde la PCa desactiva el FVa. En ambos casos resultaban en una sustitución del aminoácido Arg 306, en uno el cambio descrito era a Thr (G1091C) y en el otro a Gly (A1090G) (Chan *et al.*, 1998; Williamsom *et al.*, 1998). El caso de Arg306Thr, denominada Factor V Cambridge, se describió en individuos de una familia con trombofilia hereditaria y con el fenotipo de RPCa (Williamson *et al.*, 1998). Sin embargo la Arg306Gly presentaba una prevalencia del 4,7% en población general de Hong Kong. Además, no siempre se encontraba asociada al fenotipo RPCa (Chan *et al.*, 1998).

También se han descrito otros estudios donde se analizaron polimorfismos en el gen *F5* para investigar otras causas responsables del fenotipo de la RPCa.. En concreto, se ha descrito un haplotipo denominado HR2, formado por 6 polimorfismos en el exón 13 del gen *F5* y una variación en la secuencia del exón 16, que podrían estar implicados en el fenotipo de la RPCa (Bernardi *et al.*, 1997). La presencia de este haplotipo se encontró incrementada en aquellos pacientes heterocigotos para el FVL y que mostraban una RPCa severa, y más frecuentemente en pacientes con RPCa en ausencia de la mutación FVL (Bernardi *et al.*, 1997). Este haplotipo HR2 también ha sido asociado con la variabilidad de los niveles de plasma del FV (Lunghi *et al.*, 1996), y con un incremento en el riesgo a padecer trombosis venosa (Alhenc-Gelas *et al.*, 1999).

2.3.4.3. Implicaciones de otros genes en el fenotipo RPCa.

El fenotipo de la RPCa podría ser debido en teoría a mutaciones en lugares críticos del gen *F8*, sin embargo no se han identificado mutaciones en este gen en pacientes con RPCa (Lane y Grant 2000). Recientemente, Soria *et al.* (Soria *et al.*, 2003) han descrito un nuevo *QTL* en una región en el cromosoma 18, que influye pleiotropicamente sobre el fenotipo RPCa y la actividad del FVIII y su relación con la susceptibilidad a padecer

trombosis venosa. En este QTL no existe ningún gen candidato conocido hasta el momento relacionado con la trombosis. Por ello, este *locus* parece representar un nuevo factor de riesgo trombótico.

2.3.5-Mutación PT20210A

En 1996 Poort *et al.* (Poort *et al.*, 1996) publicaron una sustitución G→A, en el nucleótido 20210 en la región 3'-no traducible del gen de la protrombina (PT20210A), que mostraba asociación con la trombosis venosa. El 18% de los pacientes analizados presentó una prevalencia más elevada del alelo 20210A de esta variante genética comparado con el 1% en el grupo de controles sanos. De este modo la presencia de esta mutación mostraba un incremento de riesgo de casi 3 veces superior de padecer trombosis venosa (Poort *et al.*, 1996). Estos resultados se han corroborado por otros estudios posteriores (Rosendaal *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1997; Souto *et al.*, 1998).

El mecanismo por el cual esta mutación incrementa el riesgo trombótico no es bien conocido aunque se ha demostrado una asociación entre esta mutación y el incremento de niveles de protrombina en plasma (Souto *et al.*, 1999). La hipótesis más aceptada hace referencia a un posible incremento de la eficiencia de poliadenilación del ARN mensajero transcrito (Poort *et al.*, 1996; Ceelie *et al.*, 2004).

En general, las manifestaciones clínicas también son parecidas a las descritas en las deficiencias de PC, PS o AT y en portadores de FVL. Aunque aún no existe una casuística bien definida sobre la clínica asociada a esta mutación, como en el caso del FVL, la ausencia de trombosis en la mayoría de los heterocigotos y en algunos homocigotos (Souto *et al.* 1999) indican que el riesgo trombótico asociado a la PT20210A es inferior que el asociado a las deficiencias plasmáticas en PC, PS o AT, incluso que a la mutación FVL.

Se ha publicado una interacción de la mutación PT20210A con la mutación FVL en un estudio retrospectivo de 112 pacientes con FVL comparado con 17 pacientes con ambas mutaciones. En este estudio se observó que el riesgo de trombosis recurrente después de un primer episodio era superior (OR 2,6; IC 95%: 1,3 a 5,1) en aquellos pacientes portadores de ambas mutaciones (De Stefano *et al.*, 1999).

La mutación de la PT20210A esta también asociada a un incremento del riesgo trombótico en aquellas pacientes que utilizan antioceptivos orales (AO), y este riesgo se

multiplica si además presentan ambas mutaciones, FVL y PT20210A (Martinelli *et al.*, 1999; Santamaría *et al.*, 2001).

2.3.6-Polimorfismo Val34Leu del gen del FXIII

El polimorfismo Val34Leu del gen del FXIII se encuentra situado en la zona que traduce para el péptido de activación del FXIII de la coagulación (Arg37 y la Gly 38). Este polimorfismo es relativamente común, con una frecuencia alélica alrededor del 25-30% en la población general (Attíe-Castro *et al.*, 2000). Aunque el cambio de valina a leucina es un cambio relativamente conservador, este polimorfismo Val34 Leu tiene un efecto significativo en la función del FXIII (Ariëns *et al.*, 2002). La activación del FXIII en los portadores del alelo Leu34 mediante la acción de la trombina sucede más rápidamente que en la variante Val34. El mecanismo por el cual se acelera esta activación por trombina no se conoce del todo, sin embargo varios estudios han sugerido que los posibles cambios conformacionales podrían jugar un papel importante (Ariëns *et al.*, 2002). Los coágulos de fibrina formados en presencia de Leu34 muestran fibras más finas y con características de permeabilidad alteradas cuando se compara con la estructura de coágulos de fibrina formados en presencia de la variante alélica Val34. Hasta el momento 6 estudios tipo caso-control han investigado la relación entre el FXIII Val34Leu y la trombosis venosa (Ariëns *et al.*, 2002). Tres han mostrado un papel protector a padecer trombosis venosa en pacientes portadores del polimorfismo Val34Leu, mientras que en los otros 3 no se ha encontrado asociación. Dos estudios han analizado la posible interacción entre FXIII Val34Leu y el FVL, pero ninguno ha encontrado resultados significativos. Estos resultados contradictorios, podrían estar indicando que la relación entre este polimorfismo Val34Leu y la trombosis venosa puede ser compleja, y que harían falta estudios con un mayor número de casos y controles que tengan en cuenta otros factores genéticos o ambientales involucrados en la patogenia de la enfermedad (Ariëns *et al.*, 2002).

2.3.7-Grupos sanguíneos no-O.

Desde los años 60 y principios de los 70, varios estudios han evidenciado la relación entre el grupo sanguíneo del sistema ABO y el riesgo de enfermedad cardiovascular (Medalie *et al.*, 1971; Meade *et al.*, 1994). Esta relación se ha establecido a través de la asociación observada entre el grupo ABO y los niveles de FVIII (Orstanik *et*

al., 1985; Mansvelt *et al.*, 1998) por una parte, y los niveles de vWF por otra (Kamphuisen *et al.*, 1998), ya que los niveles de estas proteínas están claramente relacionados con el riesgo cardiovascular (Koster *et al.*, 1995).

No disponemos de datos sobre la prevalencia de los diferentes grupos sanguíneos en pacientes con trombosis, ni existe una casuística bien definida sobre la clínica asociada a ellos. Sin embargo, recientemente, se ha demostrado por primera vez una implicación genética directa entre el grupo sanguíneo del sistema ABO y el riesgo a sufrir episodios trombóticos (Souto *et al.*, 2000c) muy probablemente por su efecto como determinante genético de los niveles plasmáticos de vWF y FVIII. Altas concentraciones de FVIII han sido relacionadas con un incremento del riesgo de trombosis (Koster *et al.*, 1995) y la concentración de FVIII está determinada en parte por el grupo sanguíneo, lo que se evidencia por la relación entre los grupos no-O y el riesgo de trombosis (Koster *et al.*, 1995, Jick *et al.*, 1969).

2.3.8- Incremento de los niveles de factores de la coagulación.

2.3.8.1- Niveles elevados de FVIII.

El FVIII es un importante cofactor en la activación del FX por el complejo *tenase* (FVIIIa/FIXa). Los niveles elevados de FVIII podrían ser potencialmente protrombóticos por producir un incremento de estabilidad del complejo *tenase* o por conferir una cierta RPCa (Mannucci *et al.*, 1999). Así, los niveles elevados de FVIII se han asociado a la trombosis venosa (Koster *et al.*, 1995). Niveles superiores a 150 UI/dl se asocian a un incremento del riesgo de padecer trombosis, con una OR:4,8 (95% IC: 2,3 a 10) y su prevalencia en la población general es de un 11% y en los pacientes con trombofilia de un 25% (Koster *et al.*, 1995) (tabla 2). La asociación entre los niveles de FVIII y la trombosis venosa se ha confirmado en varios estudios posteriores (Kraaijenhagen *et al.*, 2000; O'Donnell *et al.*, 1997; Kamphuisen *et al.*, 1999).

Se ha observado que los niveles elevados de FVIII persisten a lo largo del tiempo, y son independientes de la fase aguda de la enfermedad tromboembólica (O'Donnell *et al.*, 2000, Kamphuisen *et al.*, 1999). Sin embargo hasta el momento no está definido el valor de punto de corte crítico de los niveles plasmáticos de FVIII a partir del cual se incrementa el riesgo a padecer trombosis.

Actualmente, se acepta que existe una clara base genética que determina los niveles de FVIII (Kamphuisen *et al.*, 1998; Schambeck *et al.*, 2001) con una heredabilidad del 40%, es decir, que el efecto de los genes explica el 40% de la variancia de los niveles de FVIII (Souto *et al.*, 2000c).

Como hemos explicado en el apartado anterior los niveles de FVIII varían en parte en función del tipo de grupo sanguíneo (ABO) (Orstavik *et al.*, 1985; Souto *et al.*, 2000). Sin embargo, la variabilidad total de los niveles de FVIII no se explica solamente sobre la base del grupo sanguíneo. Recientemente se ha identificado otro *locus* en el cromosoma 18 que influye a la vez en la variación normal del FVIII y en la susceptibilidad a la trombosis (Soria *et al.*, 2003)

2.3.8.2 Niveles elevados de FIX, FXI y fibrinógeno.

También se ha descrito que niveles altos tanto de FXI como de Factor IX (ambos por encima del percentil 90) se asocian a un incremento entre 2-3 veces de riesgo trombótico (Meijers *et al.*, 2000; van Hylckama *et al.*, 2000). Los niveles elevados de fibrinógeno también se asocian a un incremento de riesgo trombótico (Rosendaal 1999), pero son necesarios estudios adicionales para definir exactamente la prevalencia y la significación clínica de este factor de riesgo cardiovascular. Dada la clara implicación de los niveles de los factores de la coagulación en el aumento de riesgo trombótico, la identificación de los factores genéticos que determinan estos niveles constituye una de las grandes líneas de investigación en el campo de la enfermedad tromboembólica.

2.3.9- Hiperhomocisteinemia.

La hiperhomocisteinemia (elevación anormal en plasma de la concentración de homocisteína) es un factor de riesgo de tromboembolismo venoso, ya que aumenta el riesgo de padecer esta enfermedad entre 2-4 veces (Makris 2000; Den Heijer *et al.*, 1996). Se han identificado algunas causas adquiridas de hiperhomocisteinemia, entre ellas, las deficiencias de vitamina B₁₂, B₆ o ácido fólico, la edad avanzada, la insuficiencia renal crónica, el consumo de tabaco y el uso de drogas antifólico.

También se ha relacionado la hiperhomocisteinemia con defectos genéticos en enzimas que afectan a las vías del metabolismo de la homocisteína como son la transulfuración y la remetilación (Boushey *et al.*, 1995). Uno de estos defectos genéticos

afecta a la cistationina β -sintetasa (CBS) donde se ha descrito cómo el defecto en homocigosis produce una hiperhomocisteinemia intensa, que se asocia tanto al tromboembolismo venoso como a la enfermedad vascular arterial en edades tempranas de la vida (Mudd *et al.*, 1995).

Otro de estos factores genéticos asociado a hiperhomocisteinemia es la mutación C677T en el gen de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (Frosst *et al.*, 1995). Esta mutación genera una variante termolábil de esta enzima implicada en el metabolismo de la homocisteína y produciendo así incremento de sus niveles en plasma. Este tipo de hiperhomocisteinemia aparece especialmente en conjunción con un déficit de folato. Este polimorfismo fue descrito inicialmente por Kang *et al.* (Kang *et al.*, 1991) como un factor de riesgo independiente de la enfermedad coronaria arterial. También se ha descrito como los pacientes homocigotos para esta mutación presentan un incremento de riesgo a la trombosis venosa. Sin embargo, en un estudio global de metanálisis donde se analizaron los resultados obtenidos por varios estudios, no se ha podido confirmar que la mutación C677T produzca realmente un aumento de riesgo al tromboembolismo venoso (Brattstrom *et al.*, 1998). Por consiguiente su verdadera implicación como factor genético de riesgo trombótico independiente actualmente es controvertida (De Stefano *et al.*, 2000).

Recientemente, se ha estimado que la heredabilidad de los niveles de homocisteína en población española es de un 24%, lo cual demuestra la existencia de una base atribuible a factores genéticos (Souto *et al.*, 2000b). También se ha demostrado que los niveles de homocisteína en plasma tienen una alta correlación genética con la trombosis (Souto *et al.*, 2000a). Estos datos implican que existen factores genéticos que de forma conjunta están influyendo en los niveles de homocisteína y en el riesgo de padecer accidentes trombóticos.

2.3.10- Otros factores potenciales de trombofilia hereditaria.

Aparte de los factores e inhibidores de la coagulación sanguínea anteriormente expuestos, otros factores de la coagulación o del sistema fibrinolítico pueden estar implicados en la predisposición a desarrollar trombosis. En este sentido se han descrito pacientes con hipo y displasminogenemias asociadas a historia de trombosis venosas recurrentes, pero en sus familias existe un porcentaje muy bajo de miembros sintomáticos

portadores del defecto (Dolan *et al.*, 1998). Además, la prevalencia de este tipo de defectos se ha estimado en menos de un 3% en pacientes con trombofilia familiar y se ha sugerido que sería un factor de riesgo muy débil para el desarrollo de trombosis (Dolan *et al.*, 1988). Defectos en otros componentes fibrinolíticos como el t-PA y niveles altos del PAI-1 pueden ser potencialmente asociados a trombosis, aunque por la gran variabilidad de los niveles individuales y por los inconvenientes metodológicos para poder cuantificar la actividad de estos componentes, es muy difícil establecer su implicación en la enfermedad (Angleton *et al.*, 1989; Chandler *et al.*, 1990).

Otros factores como los niveles elevados de FV o de factor tisular, la deficiencia de trombomodulina, del TFPI o de precalicreina podrían teóricamente aumentar el riesgo de padecer trombosis (Franco *et al.*, 2001b).

Desde el punto de vista genético son muchos los polimorfismos ubicados en diferentes genes candidatos (la mayoría de los que codifican las proteínas anteriormente citadas) que están siendo sometidos a estudios de asociación para determinar su implicación en la enfermedad tromboembólica. Destacaríamos la inserción de 23 pares de bases en el exón 3 del gen del receptor endotelial de la PC (EPCR) y diversos polimorfismos en los genes que codifican para receptores plaquetares (Corral *et al.*, 1999). La verdadera participación de estos polimorfismos en la patología tromboembólica está por demostrar o es controvertida debido a la descripción de resultados contradictorios (Lane y Grant 2000).

A la larga lista de potenciales factores genéticos implicados en la enfermedad tromboembólica se ha añadido recientemente el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI). Se han descrito varios polimorfismos en el gen que codifica este potente inhibidor de la fibrinólisis que por su efecto sobre los niveles de TAFI en sangre podrían modular el riesgo de trombosis (Franco *et al.*, 2001).

2.4- Prevalencia de los factores de riesgo de trombosis venosa

El impacto de un factor de riesgo esta en función de su prevalencia en la población estudiada y del riesgo relativo que suponga ese factor de riesgo para la enfermedad en estudio. En la Tabla 2 se muestran la prevalencia de varios factores de riesgo en la población general y en pacientes con trombofilia (Rosendaal 1997; Tait *et al.*, 1995; Tait *et al.*, 1994; Rosendaal *et al.*, 1995).

Las deficiencias de PC, PS y AT son poco frecuentes, y en su conjunto todas estas deficiencias incrementan el riesgo de trombosis sobre unas 10 veces (Lane *et al.*, 1996). Sin embargo, aunque la prevalencia de estas deficiencias sea baja presentan un elevado riesgo de trombosis venosa (tabla 3). Así los portadores heterocigotos para una deficiencia en AT tienen un alto riesgo de desarrollar trombosis, el cual se incrementa con la edad. El 50% de los pacientes portadores son sintomáticos a los 24 años, que es la mediana de edad de presentación del primer episodio trombótico (tabla 3). El porcentaje de pacientes que presentan clínica trombótica a una edad inferior a los 24 años va disminuyendo al 40%, 15% y hasta un 5% en los casos de deficiencia de PS, PC y RPCa respectivamente (tabla 3) demostrándose así que el fenotipo RPCa es un factor de riesgo más débil que los anteriores.

Los cuatro defectos que han sido descritos asociados a trombosis venosa que resultan más comunes en la población general son: la RPCa (FVL), PT20210A, niveles elevados de FVIII, y la hiperhomocisteinemia (tabla 2).

En el caso de la mutación FVL, la prevalencia, tal como se ha descrito, varía en función de las diferencias en la distribución geográfica resultando más elevada (15%) en el norte y en el centro de Europa. La prevalencia de la mutación PT20210A en la población general también varía en función del área geográfica entre un 2-6%, con una prevalencia más alta en el sur que en el norte de Europa (Souto *et al.*, 1998; Rosendaal *et al.*, 1998).

En el caso de los niveles elevados de FVIII tal como se ha observado en los diferentes estudios mostrados en el apartado 2.3.8 dependerá del punto de corte que se haya aplicado en el análisis, así niveles de FVIII superiores a 150 UI/dl están asociados con un incremento de casi 5 veces más riesgo a padecer trombosis venosa (Koster *et al.*, 1995). De manera similar los niveles de homocisteína dependerán del punto de corte de cada población estudiada, así se ha descrito como valores superiores a 18 $\mu\text{mol/L}$ se encuentran en un 5% de la población general en Holanda, y un 10% en población italiana y representa un aumento riesgo de 2,5 veces más de padecer trombosis (Simioni *et al.*, 1996; Den Heijer *et al.*, 1996).

Tabla 2. Prevalencia (%) de los diferentes factores de riesgo tromboembólico. ¹Niveles de FVIII \geq 150IU/dl; ²Niveles de FIX > percentil 90; ³Niveles de FXI > percentil 90.

Factor de riesgo	Referencia*	Población General	Pacientes con trombofilia
Deficiencia AT	a.	0,02	1-3
Deficiencia PC	a.	0,1-0,5	3-5
Deficiencia PS	a.	0,03-0,13	0,5-8
Factor V Leiden	b.	1-5	10-50
PT21210A	c.	2-6	6-18
Hiperhomocisteinemia	d.	5	10
Niveles altos de FVIII¹	e.	11	25
Niveles altos de FIX²	f.	3	7,5
Niveles altos de FXI³	g.	10	19

*Datos basados en: a: Rosendaal 1997; Tait *et al.*, 1995; Tait *et al.*, 1994; Miletich *et al.*, 1987;b: Lane *et al.*, 1996; Rees *et al.*, 1995; Koster *et al.*, 1993; c: Poort *et al.*, 1996; Rosendaal *et al.*, 1998; Souto *et al.* 1998 d: Simioni *et al.*, 1996, Den Heijer *et al.*, 1996; e: Koster *et al.*, 1995 ; f: van Hylckama *et al.*, 2000; g: Meijers *et al.*, 2000.

Tabla 3. Porcentaje de pacientes con deficiencias hereditarias asociadas a trombosis venosa, que han sufrido un primer episodio trombótico antes de los 15, 24 y 50 años.

Deficiencia en	Riesgo del primer episodio trombótico (%)*		
	>15 años	>24 años	>50 años
Antitrombina	10	50	85
Proteína S	1	40	80
Proteína C	1	15	50-80
RPCa	1	5	25

* Datos basados en Thaler *et al.*, 1981; Hirsh *et al.*, 1989; Engesser *et al.*, 1987; Broekmans *et al.*, 1988; Allaart *et al.*, 1993; De Stefano *et al.*, 1994a; Dahlbäck 1995a.

3. Métodos de estudio de la trombofilia.

Actualmente, la trombofilia hereditaria se considera una enfermedad compleja causada por la interacción de múltiples genes entre sí (epistasis) y de estos genes con factores ambientales (Rosendaal *et al.*, 1999; Bertina 2001). Estas interacciones determinaran en cada individuo el grado de susceptibilidad a la trombosis, como la predisposición de cada individuo a padecer la enfermedad (Rosendaal *et al.*, 1999, Bovill *et al.*, 1999).

Sin embargo y pese a los grandes esfuerzos invertidos en la última década en el estudio de la enfermedad trombótica, nuestros conocimientos sobre la base molecular de esta patología son escasos, más si se tiene en cuenta que el 60% (heredabilidad de 0,6) de la predisposición a la trombosis es atribuible a factores genéticos (Souto *et al.*, 2000a, Heit *et al.*, 2004). Durante los últimos 35 años algunos de estos factores de riesgo genéticos han sido identificados en familias de pacientes con trombofilia portadores de deficiencias de AT, PC, PS o RPCa, asociado a la mutación FVL (Egerberg 1965; Comp y Esmon 1984; Dahlbäck *et al.*, 1993; Bertina *et al.*, 1994). Más recientemente, la variante alélica en el gen de la protrombina PT20210A y el los grupos sanguíneos no-O también se han asociado a la trombosis venosa (Jick *et al.*, 1969; Poort *et al.*, 1996; Souto *et al.*, 2000).

Los factores genéticos de riesgo trombótico conocidos sólo se han identificado, en el mejor de los casos y dependiendo de la población estudiada, en el 60% de las familias con trombosis hereditaria (Mateo *et al.*, 1998). El gran reto en la actualidad es la identificación de los factores genéticos de riesgo trombótico en el 40% de las familias restantes, portadoras de trombofilia inexplicada o idiopática, que no presentan ninguno de los factores conocidos asociados a enfermedad tromboembólica. Además teniendo en cuenta que la trombofilia familiar es una enfermedad oligogénica (Miletich *et al.*, 1993; Koeleman *et al.*, 1994; Zöller *et al.* 1995; van Boven *et al.*, 1996; Koeleman *et al.*, 1997,) la mayoría de los factores genéticos que pueden contribuir al riesgo de la trombosis venosa son aún desconocidos.

Así uno de los objetivos actuales es localizar los factores genéticos responsables de la variación de rasgos complejos de importancia médica, y determinar su contribución al riesgo de padecer la enfermedad en diferentes ambientes.

La estrategia utilizada para abordar el análisis de las causas genéticas implicadas en la enfermedad tromboembólica incluyen los estudios de asociación y los estudios de ligamiento genético.

3.1 Estudios de asociación.

3.1.1. Estudios caso-control.

Una de las metodologías más empleadas para abordar el estudio de la enfermedad tromboembólica se ha basado en estudios de asociación caso-control, que investigan la presencia de factores genéticos o factores fenotípicos de riesgo comparando individuos sanos (controles) con pacientes (casos) no emparentados entre ellos. En este tipo de estudio se analiza si un factor de riesgo es más frecuente en los *casos* que en los *controles*. Si en el análisis se obtiene una asociación estadísticamente significativa, se concluye que la enfermedad se asocia al factor de riesgo bajo estudio.

En los estudios de asociación genética se busca esencialmente correlaciones entre el fenotipo y genotipo (Almasy y MacCluer 2002). El fenotipo puede ser la presencia o ausencia de la enfermedad, como la trombosis venosa y el genotipo es generalmente valorado mediante algún tipo de marcador polimórfico. Los marcadores genéticos más utilizados son los polimorfismos puntuales o SNP que implica el cambio de un solo nucleótido (base) de la secuencia del ADN. Un marcador se denomina polimórfico y puede referirse como polimorfismo, si la frecuencia de la variante menos frecuente es mayor al 1%. En el análisis de asociación se analiza la frecuencia de cada alelo del marcador polimórfico en los dos grupos de individuos no relacionados. Un grupo, el de los *casos*, que presenta la enfermedad en cuestión y el otro grupo, los *controles* que no la presenta. La asociación existe cuando la frecuencia alélica difiere significativamente entre *casos* y *controles*. Para evitar falsas asociaciones, es importante que los grupos (*casos* y *controles*) sean lo más similares posible y genéticamente homogéneos (no estratificados) para evitar posibles factores correlacionados con el fenotipo que puedan inducir a confusión. Así, los dos grupos deben provenir de la misma área geográfica y han de mostrar factores similares tales como, la edad y el sexo.

Hay tres razones por las cuales se podría observar una asociación positiva, entre un marcador y un fenotipo (Almasy y MacCluer 2002). En primer lugar, es posible que la relación sea debida a que el marcador genético sea por sí mismo funcional. Esto implicaría

que los diferentes alelos marcarían cambios en la transcripción del ADN a ARN, afectando el proceso de estabilidad del ARN, de la proteína o a cambios en la estructura de la proteína. Una segunda opción es que el marcador genético no sea funcional por si mismo, pero que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con otros polimorfismos que son realmente los funcionales. Finalmente, es posible que la presencia de asociación sea debida a la estratificación de la población cuando se utilizan individuos genéticamente heterogeneos, generando errores tipo I (falsos positivos). La estratificación de la población se refiere al caso en el que las frecuencias alélicas de los marcadores genéticos pueden diferir en los diferentes grupos étnicos (heterogeneidad genética), a veces de manera significativa. Además, desde el punto de vista estadístico, también presentan problemas de exceso de falsos positivos cuando se analizan simultáneamente múltiples polimorfismos sin utilizar los factores correctores necesarios en los análisis (Gambaro *et al.*, 2000; Almasy y Mc Cluer 2003).

Teniendo en cuenta estos problemas que pueden presentar los estudios de asociación, se debería tomar precauciones en las conclusiones generadas a partir de este tipo de estudios. Además, en los estudios de asociación es muy importante diseñar bien el estudio y tener en cuenta una serie de factores de ajuste en los análisis para evitar posibles sesgos del estudio. Las poblaciones *caso-control* han de ser seleccionadas de manera rigurosa, la metodología ha de ser precisa, los valores de probabilidad han de ser suficientes para poder excluir un falso positivo, y se han de analizar los posibles factores que puedan inducir a confusión llevando a cabo los ajustes necesarios por múltiples métodos estadísticos. Por otro lado, si los diferentes alelos del marcador genético analizado generan cambios en la estructura de los aminoácidos de la proteína o si se han identificado en estudios *in vitro* previos que existen diferencias, por ejemplo, de estabilidad, localización, unión, o niveles de transcripción de los productos de cada uno de los diferentes alelos, entonces se podría tratar de un caso en el que el marcador genético es funcional y directamente esta influyendo en el fenotipo (Almasy y Mac Cluer 2002).

Hay que tener en cuenta que una asociación negativa tampoco excluye que el gen estudiado este implicado en el riesgo de padecer la enfermedad. Simplemente indica que el marcador genético que se ha utilizado en el análisis no está suficientemente ligado al que realmente es funcional y causa el riesgo (Weiss 1993, Rao y Province 2001).

Los estudios de asociación representan una herramienta indispensable para el análisis de las enfermedades complejas como la trombofilia y complementaria a los estudios de ligamiento genético. En términos generales, los métodos de ligamiento genéticos son buenos para localizar nuevos marcadores genéticos y los métodos de asociación para analizar los marcadores conocidos y correlacionarlos con la enfermedad, así como, poder analizar el riesgo que implica ese marcador en la población del estudio. Es pues esencial saber cuando utilizar un determinado diseño de estudio y cómo debe aplicarse cada método.

Recientemente se han descrito dos trabajos, una editorial de la revista científica *Nature Genetics* (Editorial *Nature Genetics*, 1999) y otro trabajo por Cooper *et al.* (Cooper *et al.*, 2002) en los que se proponen las características ideales que deberían tener los estudios de asociación genéticos: un tamaño de muestra grande, los valores de significación estadística pequeños (valores P), resaltar las asociaciones que tengan un sentido biológico y los alelos que afecten al producto del gen en una vía con un sentido fisiológico. Además, estos estudios deberían incluir un estudio inicial como una replicación independiente, la asociación debería ser observada tanto en estudios familiares como en estudios basados en la población y el riesgo (OR) atribuible debería de ser elevado.

3.1.2. Estudios de asociación en familias con trombofilia.

La enfermedad tromboembólica es una enfermedad multifactorial y compleja, donde, al menos, dos defectos genéticos distintos podrían segregarse en una familia con trombofilia. Cuando se conoce un defecto genético en una familia esta puede ofrecer una gran oportunidad para encontrar un segundo defecto (Bovill *et al.*, 2000; Hasstedt *et al.*, 1998).

Se han descrito varios estudios de asociación en familias con trombofilia en las cuales se ha identificado un defecto genético conocido (PC, PS, etc) y se han comparado mediante curvas de supervivencia libre de trombosis (análisis de Kaplan-Meier), (Kaplan y Meier 1958) a los portadores y no portadores del defecto (Koeleman *et al.*, 1997). Entre las familias con una clara tendencia a la trombosis, la prevalencia de defectos trombogénicos es mucho más elevada que entre pacientes con trombosis no seleccionados, consecutivos (pacientes con trombosis que acuden consecutivamente al hospital). Así, en familias con

trombofilia se observa una prevalencia del 15% de PC, PS y AT y del 20% de PT20210A y de un 40-60% para el FVL, cifras mucho mayores a las encontradas en individuos consecutivos. Además, el riesgo de padecer trombosis venosa en miembros de estas familias con trombofilia es más elevado que entre individuos consecutivos con defectos similares (Miletich *et al.*, 1987; Bertina *et al.*, 1994). Se ha observado que la media de edad de la primera trombosis en pacientes de familias con trombofilia es más temprana que en pacientes consecutivos con trombosis, independientemente del defecto causante. Hay que remarcar que en estas familias con trombofilia la trombosis sucede a una edad más joven incluso en familiares que no padecen el defecto principal identificado en su familia. Todas estas observaciones demostraron que en estas familias había varios factores genéticos causantes de la enfermedad. Cuando en 1994 se describió el FVL y se analizó dicha alteración en familias con déficit de PC se observó que era bastante frecuente. El riesgo de trombosis era mucho más elevado en los miembros de las familias portadores de los dos defectos (déficit de PC y mutación FVL), que en aquellos que sólo existía uno de los defectos, déficit de PC o FVL (Koeleman *et al.*, 1994). A partir de este trabajo se evidenció que el riesgo de trombosis asociado al déficit de la PC estaba sobrestimado, ya que parte de este exceso de riesgo era atribuible a la mutación FVL, en un principio desconocida.

Por consiguiente, los estudios de asociación en este tipo de familias con trombofilia que ya presentan un factor de riesgo conocido, son útiles para poder analizar las diferentes interacciones gen-gen, que pueden existir en esta enfermedad compleja, ya que se puede analizar el riesgo que estas interacciones representan pues en ocasiones se generan sinergismos de factores de riesgo tromboembólico.

3.2 Estudios de ligamiento genético.

Los análisis de ligamiento genético permiten demostrar la cosegregación dentro de una familia de una enfermedad y las variantes genéticas responsables, es decir, establece relaciones de causa-efecto. Existen diferentes diseños para este tipo de análisis familiares: estudio de gemelos, pares de hermanos, pequeños núcleos familiares o familias extensas. Es importante tener en cuenta que cualquiera de estos diseños experimentales también permite realizar análisis de asociación. Sin embargo, los estudios familiares, a diferencia de los estudios de asociación (ver apartado 3.1), son los únicos que permiten detectar genes desconocidos causantes de la enfermedad (Blangero *et al.*, 2003).

La base de estos métodos descansa en la genética de rasgos cuantitativos que están correlacionados con el riesgo de sufrir la enfermedad, analizados en familias. En estos estudios, los efectos genéticos se cuantifican en términos de heredabilidad (h^2). La heredabilidad de un fenotipo se define como la proporción de variación de ese fenotipo atribuible exclusivamente al efecto de los genes. La estimación de la h^2 es un paso previo indispensable antes de intentar la localización de los genes, puesto que si el fenotipo no tiene h^2 o bien su h^2 es muy pequeña (por ejemplo inferior al 10%), no tiene sentido práctico la búsqueda de genes, ya que su variabilidad estará condicionada por factores no genéticos (ambientales). En el campo de la trombofilia se han publicado heredabilidades de muchos parámetros de la hemostasia y de la fibrinólisis (Souto *et al.*, 2000b; de Lange *et al.*, 2001; Tosetto *et al.*, 2000).

Una vez demostrado que un fenotipo (la enfermedad, o un fenotipo asociado a la enfermedad) es heredable, el siguiente paso es localizar las regiones cromosómicas (*loci*) que contienen genes que influyen en la variabilidad de ese fenotipo, cada uno de estos *loci* se conoce como QTL (*quantitative trait locus*, o *locus* de rasgo cuantitativo). La localización de los QTLs se consigue mediante el análisis de ligamiento genético. Existen diferentes estrategias estadísticas para realizar este tipo de análisis, pero uno de los más informativos está basado en los componentes de la variancia (*variance-components linkage analyses*) en familias extensas (Almasy y Blangero 1998). La herramienta matemática básica para el análisis de estos fenotipos intermediarios (asociados a la enfermedad) es el análisis de la variancia, que permite separar el efecto debido a los factores genéticos del efecto causado por los factores ambientales, que influyen en el fenotipo cuantitativo y en la enfermedad compleja bajo estudio. La idea general es que los familiares que se asemejen más en un determinado fenotipo (por ejemplo, niveles de FVIII) deben compartir más alelos en los marcadores alrededor del gen que está influyendo ese fenotipo, mientras que otros familiares que sean más dispares para ese fenotipo no serán portadores de alelos idénticos.

En la detección, localización e identificación de QTLs implicados en las enfermedades complejas se sigue una rutina específica, en la que el primer paso es la localización de las regiones cromosómicas implicadas en la variabilidad del fenotipo a través de un análisis global del genoma. Una vez localizada una región en el genoma ligada al fenotipo, el siguiente paso es la identificación de genes en esa zona. La información

obtenida en el proyecto Genoma Humano es de gran utilidad, ya que aporta un catálogo completo de los genes y marcadores ubicados en la región cromosómica de interés.

En el campo de la trombofilia, hay todavía una experiencia limitada con este tipo de estudios y el conocimiento de las diferentes contribuciones genéticas en la trombofilia es por consiguiente incompleto. Si bien actualmente, se están aplicando nuevas tecnologías para intentar elucidar algunos de los posibles factores genéticos. El proyecto GAIT (*Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia*) es un estudio que incluye el primer análisis global del genoma orientado a conocer las bases genéticas de la trombofilia (Soria *et al.*, 2002). Una vez localizados e identificados los determinantes genéticos es cuando serán necesarios los estudios de asociación ya que permiten analizar el efecto que estos genes representan para el riesgo a padecer tromboembolismo venoso en nuestra población.

3.3-Interacción gen-gen.

Dentro de la trombofilia, como enfermedad compleja, la forma más inusual pero más grave de interacción gen-gen se presenta en los casos de mutaciones en homocigosis que causan pérdida de función de los genes que codifican para los inhibidores de la coagulación.

Las deficiencias homocigotas de PC o de PS presentan manifestaciones trombóticas muy severas a una edad temprana, y siempre presentan un riesgo trombótico superior respecto a sus familiares heterocigotos para estas deficiencias (Lane *et al.* 1996). Los casos con homocigosis para las deficiencias de PC o de PS son poco frecuente pero pueden llegar a producir *purpura fulminans* en neonatos (ver apartados 2.3.2 y 2.3.3). La *purpura fulminans* neonatal se caracteriza por la aparición de zonas extensas de necrosis cutánea en partes acras, debidas a la trombosis de vasos de calibre mediano y pequeño. Tiene muy mal pronóstico si se retrasa el tratamiento que consiste a administrar proteína C, ya sea transfundiendo plasma o mejor aportándola en forma de concentrados.

Los homocigotos para la deficiencia de la AT suelen ser incompatibles con la vida (Hakten *et al.*, 1989), pero son extraordinariamente infrecuentes. La homocigosis para la mutación FVL resulta mas frecuente (1 por 500 individuos). Los pacientes portadores de la mutación FVL en heterocigosis muestran un riesgo elevado de trombosis de entre 3,5 a 7 veces superior a los no portadores (Koster *et al.*, 1993) y en estado homocigoto el riesgo de padecer trombosis venosa se incrementa hasta unas 50-100 veces más (Rosendaal *et al.*,

1995; Caprini *et al.*, 2004). El riesgo trombótico para los individuos homocigotos para esta mutación, FVL, es elevado respecto a individuos no portadores, sin embargo no es tan alto como en los individuos con deficiencias homocigotas de los inhibidores de la coagulación (AT, PC, PS). Muchos pacientes homocigotos para el FVL no desarrollan clínica trombótica hasta la edad avanzada (Rosendaal *et al.*, 1995) y esta misma situación parece suceder en los homocigotos para la mutación PT20210A. La posible explicación de la ausencia de trombosis en estos individuos comparado con los homocigotos de deficiencias en los inhibidores de la coagulación (AT, PC, PS), es que estas mutaciones ocasionan una ganancia en lugar de una pérdida de función.

En el caso de la mutación FVL, el fenotipo de RPCa que genera hace que el FVa persista más tiempo en sangre, ya que esta molécula de FVa mutada es más resistente a la acción inhibitoria del sistema anticoagulante de la PC. Así, se produce una ganancia de función procoagulante. En el caso de la mutación PT20210A, los portadores tienen niveles más elevados de protrombina que los no afectados. De esta manera también se genera una ganancia de su función procoagulante. En cambio en las deficiencias de AT, PC o PS hay una disminución de la proteína o disminución de su actividad con la consiguiente pérdida de función anticoagulante (Caprini *et al.*, 2004).

Otra combinación posible de la interacción gen-gen es el que se produce en el caso de familias con trombofilia asociada a la combinación de dos o más factores de riesgo genético diferentes. En estas familias se observa una mayor prevalencia de clínica trombótica y los individuos con más de un factor de riesgo presentan clínica a una edad más temprana respecto a los familiares portadores de un sólo defecto (Koeleman *et al.*, 1994; Zöller *et al.*, 1995). Se ha descrito la presencia de interacción entre la mutación FVL y defectos en el gen de la PC o la PS. En estos estudios, el 40% de los pacientes sintomáticos que pertenecen a familias con deficiencia de PS también son portadores del FVL. Otros estudios indican que en el 30% de esas familias también cosegrega la mutación PT20210A, contribuyendo a incrementar el riesgo trombótico (Makris *et al.*, 1997). También se ha descrito la interacción entre el FVL y la deficiencia en AT (van Boven *et al.*, 1996). Sin embargo, la interacción más frecuente se produce entre el FVL y la PT20210A, en cuyo caso entre el 10-12% de los pacientes sintomáticos portadores del FVL también son portadores de la PT20210A (Makris *et al.*, 1997). Esta interacción es

debida principalmente a la alta prevalencia de estas dos mutaciones en la población general (Rosendaal *et al.*, 1998; Rees *et al.*, 1995).

Es de destacar que incluso considerando las interacciones gen-gen de los defectos conocidos, que incrementan el riesgo de padecer trombosis, estas no explican todos los casos de trombofilia familiar, indicando que existen factores de riesgo trombótico todavía sin identificar.

3.4-Interacción gen-ambiente.

La trombofilia hereditaria es considerada una enfermedad compleja en la que interactúan múltiples genes y también factores ambientales (Bertina 2001). El posible efecto que generan al interactuar (convergencia) estos factores genéticos y ambientales requiere una investigación exhaustiva.

En pacientes con trombofilia hereditaria, alrededor del 40-50% de los episodios trombóticos, tanto en la primera manifestación como en recurrencias, existen factores de riesgo adquiridos asociados. En los diferentes estudios realizados hasta el momento se han descrito claras situaciones de riesgo con efecto sinérgico. Entre ellos están: la cirugía mayor (en especial ortopédica), los traumatismos y la inmovilización prolongada y, en mujeres, el embarazo, el puerperio o los tratamientos hormonales (anticonceptivos orales). Estas situaciones son con frecuencia la causa desencadenante de la trombosis (Rosendaal 1999).

Entre el 12-17% de los episodios trombóticos en el caso de las mujeres están asociados a embarazos, con un 70-75% de ellos en el puerperio. Dadas las repercusiones clínicas que pueden desencadenar, la combinación de estos factores ha sido extensamente estudiada. Así, por ejemplo, se ha reportado que 1 de cada 4 embarazos (25%) en mujeres con trombofilia hereditaria se complica con trombosis, aunque existen diferencias significativas entre el tipo de deficiencia (Conard *et al.*, 1990; Vicente *et al.*, 1994). Por otro lado la ingestión de anticonceptivos orales, como factor asociado a la trombosis en trombofilia hereditaria ha sido estimada en un 7% (Girolami *et al.*, 1991), con un riesgo significativamente alto en mujeres con deficiencia en AT (Conard *et al.*, 1990; Pabinger *et al.*, 1994). En otro estudio se ha descrito un alto riesgo de trombosis asociado a la ingestión de anticonceptivos orales en mujeres con trombofilia hereditaria sea cual sea la deficiencia de la que son portadoras (DeStefano *et al.*, 1994). Pero, donde mejor se ha ilustrado la

interacción entre gen-ambiente en el aumento de riesgo trombótico es en el estudio de las mujeres portadoras de las mutaciones FVL o PT20210 y el uso de anticonceptivos orales (Vandenbroucke *et al.*, 2001;). En el *Leiden Thrombophilia Study* el riesgo de tromboembolismo en mujeres portadoras de la mutación FVL fue 7 veces superior a las no portadoras y el uso de anticonceptivos orales aumentaba el riesgo de trombosis 3,7 veces más. Sin embargo, cuando interactuaban los dos factores en aquellas mujeres que eran portadoras del FVL y que tomaban anticonceptivos orales, el riesgo de trombosis incrementaba 34,7 veces más, lo que presupone un riesgo más alto que la suma del efecto trombótico de ambos factores por separado (Vandenbroucke *et al.*, 1994).

Además el 12% de los accidentes trombóticos estaban asociados a cirugía y entre 4-5% a inmovilización prolongada (De Stefano *et al.*, 1994; Vicente *et al.*, 1994). También se ha descrito que el 22% de las intervenciones quirúrgicas mayores en pacientes con trombofilia hereditaria tienen complicaciones trombóticas, sin diferencias significativas entre las diferentes deficiencias (De Stefano *et al.*, 1994).

En mujeres que asociaban la deficiencia de PC, o la mutación FVL o la PT20210A al uso de anticonceptivos orales se producía un incremento de riesgo de trombosis venosa de senos intracraneales de hasta 30 a 150 veces, en comparación con las que no utilizaban anticonceptivos orales y que no presentaban tal defecto (de Brujin *et al.*, 1998; Martinelli *et al.*, 1998).

En muchas de las combinaciones posibles de los diferentes factores de riesgo, no se conoce una estimación real del riesgo producto de dicha asociación y las conclusiones que se manejan actualmente están tomadas sobre la base de tan sólo uno o pocos estudios. Por consiguiente, se requieren más estudios para poder valorar el riesgo final alcanzado de la combinación de factores de riesgo adquiridos y genéticos en la aparición de trombosis.

4.- Futuro del estudio de la trombofilia.

La trombofilia es una enfermedad multifactorial y compleja, donde cada episodio clínico de trombosis representa un punto final de la historia estrictamente individual de la exposición a numerosos y diferentes factores de riesgo. Por ello, pacientes con similar predisposición genética pueden o no padecer episodios trombóticos dependiendo de la presencia de otros factores que puedan interactuar. La manera en que factores de riesgo genéticos y ambientales interactúan es, en la mayoría de los casos, desconocida.

Actualmente, con la automatización de los métodos de genotipación de marcadores genéticos y secuenciación de ADN, con la información proporcionada por el proyecto Genoma Humano y, principalmente, por el gran avance de la estadística genética y del poder computacional, se dispone de las herramientas necesarias para el estudio de la base genética que subyace en la enfermedad tromboembólica y en los fenotipos intermediarios que influyen en el riesgo a padecer esta patología. Este campo del conocimiento de los nuevos factores será importante en el futuro para la obtención de una estimación real del riesgo a padecer trombosis en individuos con diferentes combinaciones de factores genéticos y ambientales (Simioni 1999; Blangero *et al.*, 2003).

El gran reto actual es generar una lista de todos los factores genéticos y el estudio de su mecanismo fisiopatológico para poder analizar como contribuyen en esta enfermedad. La futura identificación de estos factores genéticos ayudará a incrementar el conocimiento de los mecanismo de formación de trombos en una variedad de diferentes ambientes y a diseñar estrategias de tratamiento y prevención a medida de perfil genético del individuo (Holzman *et al.*, 2000). La investigación clínica es imprescindible para el desarrollo de métodos diagnósticos, profilácticos y terapéuticos más eficaces (Bauer *et al.*, 2003; Ginsberg *et al.*, 2003). Lo que conlleva a ventajas asistenciales muy claras: mejorar la estrategia preventiva y terapéutica en los pacientes frente a situaciones de riesgo y episodios trombóticos futuros, e identificación de familiares afectos, la mayoría de ellos asintomáticos, que de otra forma no se beneficiarían de esta prevención.

OBJETIVOS

Con la finalidad de profundizar en el conocimiento de las causas genéticas de la trombofilia hereditaria, el principal objetivo de esta tesis es el análisis de factores genéticos de riesgo tromboembólico en la población española. Teniendo en cuenta el componente multifactorial y complejo de esta patología, la estrategia para alcanzar este objetivo principal se basa en diferentes enfoques teóricos y acercamientos metodológicos.

Esta estrategia nos ha llevado a marcar diversos objetivos intermediarios, los cuales se detallan a continuación:

1- Reclutamiento de pacientes con trombosis venosa profunda y controles (individuos sanos) para analizar fenotípica y genéticamente diferentes factores que puedan tener un papel importante en la enfermedad tromboembólica, estableciendo su prevalencia en población española (estudio caso-control). Este diseño también nos permitirá estimar el riesgo que representan los factores genéticos para la trombosis venosa en nuestro entorno y las características clínicas más relevantes en los pacientes portadores de estos factores genéticos. Además, podremos abordar posibles interacciones de estos factores genéticos con factores ambientales.

2- Realizar un estudio de asociación en familias con trombofilia portadores de factores genéticos de riesgo trombótico ya conocidos, con el fin de analizar la contribución de estos factores al riesgo trombótico cuando cosegregan en una familia de forma aislada o asociados a otros defectos trombóticos. Este diseño también permitirá estimar las interacciones gen-gen y el posible efecto aditivo de los diferentes factores genéticos de riesgo tromboembólico en población española.

3- Aplicar a los diseños metodológicos anteriormente citados (estudios caso control y estudio de asociación en familias) los factores genéticos de riesgo tromboembólico que se identifiquen a partir del Proyecto GAIT (*Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia*). Este estudio basado en el análisis de ligamiento genético en familias con trombofilia inexplicada ha sido diseñado para identificar nuevos factores genéticos de riesgo tromboembólico.

4- A partir de los objetivos anteriores, mejorar el diagnóstico de la trombofilia hereditaria en nuestro medio, estableciendo qué determinaciones genéticas debería incluir un estudio biológico de trombofilia en población española y desarrollando métodos diagnósticos más rápidos, sencillos y reproducibles.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población estudiada

Para la consecución de estos objetivos, seleccionamos diferentes grupos de estudio:

- 1.1 Un grupo para el estudio de asociación caso-control de la enfermedad tromboembólica venosa en población española.
- 1.2 Un grupo de familias con trombofilia portadoras de algún factor genético conocido de riesgo tromboembólico.
- 1.3 Un grupo de familias con trombofilia idiopática para el análisis de ligamiento genético.

1.1 Grupo caso-control

El reclutamiento de los individuos se llevó a cabo por nuestra Unitat d'Hemostàsia i Trombosi del Hospital de Sant Pau de Barcelona, entre noviembre del 1997 y febrero del 2002. Se reclutaron un total de 250 pacientes con tromboembolismo venoso y 250 individuos aparentemente sanos en el grupo control. Ambos grupos estaban formados por individuos no emparentados entre sí, con edad y sexo similar además de pertenecer a la misma área geográfica, para evitar una estratificación genética. Tanto los pacientes como los controles firmaron el consentimiento informado como participantes del estudio. Las características clínicas de los pacientes se muestran en la tabla nº 4.

Criterios para la inclusión en el grupo de pacientes:

- Tromboembolismo venoso diagnosticado objetivamente por los métodos apropiados para cada localización (p.ej. ultrasonografía, TAC, RMN,...).
 - Edad de la primera trombosis inferior o igual a 70 años.
 - Estudio biológico realizado en fase no aguda (mínimo de 3 meses desde el último episodio).
 - No estar recibiendo tratamiento anticoagulante oral como mínimo en los últimos 20 días.
 - Pacientes sin historia previa de enfermedad hepática crónica o síndrome nefrótico, para evitar deficiencias adquiridas de proteínas de la coagulación.
 - Ausencia de relación entre los episodios de trombosis y algún tipo de neoplasia maligna.
 - El episodio de trombosis se consideraba espontáneo en ausencia de factores adquiridos.
 - La historia trombótica familiar se consideró positiva si al menos un miembro familiar de primer o segundo grado había sufrido trombosis venosa.
-

Criterios para la inclusión de individuos en el grupo control:

- Individuos aparentemente sanos y sin antecedentes personales de enfermedad tromboembólica venosa, ni de abortos en el 2º o 3º trimestre, en el caso de las mujeres.
- Individuos sin antecedentes familiares de trombosis.
- Individuos sin historia previa de enfermedad hepática crónica o síndrome nefrótico.
- Ausencia de relación de consanguinidad con los individuos del grupo de pacientes.

Tabla 4. Características clínicas del estudio caso-control.

	N (%)
Grupo de controles	250
Sexo: Varón/Hembra	109 (44)/141 (56)
Edad (media±SD)	49,6±14,9
Grupo de pacientes	250
Sexo: Varón/Hembra	113(45)/137(55)
Edad (\bar{x} ±SD)	47,6±14
Historia familiar de trombosis	97 (39)
Edad de la primera trombosis (media ± SD)	42,1±14
Espontáneo	119 (48)
Secundaria *	131 (52)
Cirugía general	8 (32)
Cirugía ortopédica	17 (7)
Cirugía abdominal	12 (5)
Cirugía ginecológica	5 (4)
Inmovilización	48 (19)
Embarazo °	19 (21)
Anticonceptivos orales °	38 (42)
Hormonas	5 (4)
Catéter	3 (1)
Enfermedad autoinmune	2 (1)
Venas varicosas	2 (1)
Paraplejía	1 (0.4)
Otros	10 (4)
Localización de la trombosis	
Trombosis venosa profunda	155 (62)
Embolismo pulmonar #	73 (29)
Trombosis extremidades superiores	17 (7)
Trombosis venosa intracraneal	5 (2)

*Algunos pacientes presentaron más de un factor de riesgo (% de todos los casos).

° Solamente se consideraron las mujeres en edad fértil en estos casos (15-45 años).

Trombosis venosa profunda fue diagnosticada en 42 pacientes con embolismo pulmonar.

1.2 Familias con algún factor genético de riesgo trombótico conocido

Se incluyeron 132 familias españolas no relacionadas con un total de 722 miembros estudiados que asociaban algún factor genético trombótico conocido (tabla 5). Las familias fueron seleccionadas a través del *propositus* con enfermedad tromboembólica venosa, preferiblemente, con historia familiar de trombosis positiva y que mostraban un defecto trombofílico conocido. Los *propositi* fueron remitidos a nuestra Unitat d'Hemostàsia i Trombosi del Hospital de Sant Pau (Barcelona) desde su centro de origen y la mayoría eran pacientes propios de nuestro centro.

Criterios de inclusión de los *propositi*:

- Tromboembolismo venoso diagnosticado objetivamente por un método apropiado según la localización.
- Estudio biológico realizado en fase no aguda (mínimo de 3 meses desde el último episodio).
- No haber recibido tratamiento anticoagulante oral como mínimo en los últimos 20 días.
- Pacientes sin historia previa de enfermedad hepática crónica o síndrome nefrótico para evitar casos de deficiencias adquiridas de proteínas de la coagulación.
- Ausencia de relación entre los episodios de trombosis y algún tipo de neoplasia maligna.
- El episodio de trombosis se consideraba espontáneo en ausencia de factores adquiridos.
- La historia trombótica familiar se consideró positiva si al menos un miembro familiar de primer o segundo grado había sufrido trombosis venosa.
- *Propositus* con trombofilia con algún factor genético de riesgo trombótico conocido (deficiencias de AT, PC, PS, o mutaciones FVL o PT20210A).

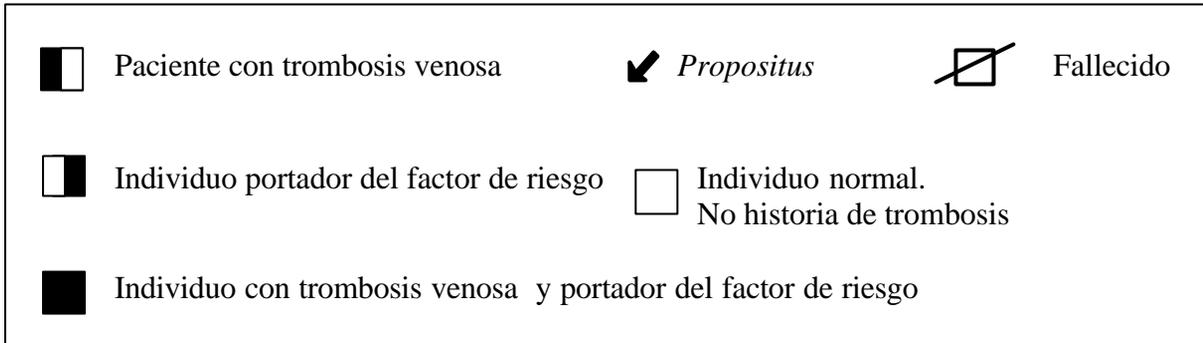
Una vez se identificaba un defecto en un paciente, se llevaba a cabo el estudio familiar para el mismo defecto.

Se incluyeron 11 familias con deficiencia de AT (10 tipo I y una tipo II), 34 con deficiencia de PC (todas tipo I), 40 con deficiencia PS (13 tipo I y 27 tipo III), 32 con la mutación FVL y 15 con la mutación PT20210A. En la tabla número 5 se muestra el número de familias estudiadas y el tipo defecto que asocian en cada caso. Además en la figura nº4 se muestran como ejemplo algunas de las genealogías de las familias analizadas en este estudio.

Tabla 5. Familias estudiadas en función del defecto que asocian. Clasificación de los individuos con clínica trombótica e individuos asintomáticos.

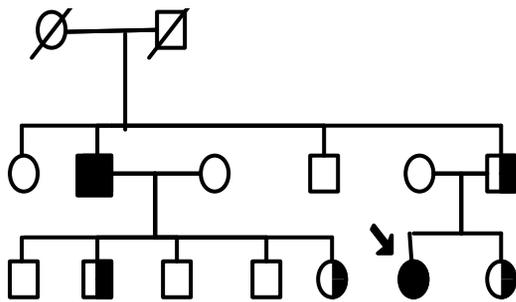
Deficiencias		Nº de familias (% del total)	TROMBOSIS (Nº de individuos)	
			SI	NO
No defecto		-	8	279
AT (n=11)	Aislado	8 (72.7)	12	2
	+FVL	2 (18.2)	2	0
	+PT20210A	1 (9.1)	2	3
PC (n=34)	Aislado	22 (64.7)	29	54
	+FVL	5 (14.7)	7	1
	+PT20210A	7 (20.6)	7	8
PS (n=40)	Aislado	31 (77.5)	49	50
	+FVL	4 (10.0)	4	4
	+PT20210A	5 (12.5)	6	5
FVL (n=32)	Aislado	26 (81.2)	32	51
	+PT20210A	6 (18.8)	10	8
PT20210A (n=15)	Aislado	15	20	69

Figura 4. Algunos ejemplos de genealogías con alguna deficiencia conocida. En cada familia se indica la deficiencia asociada.

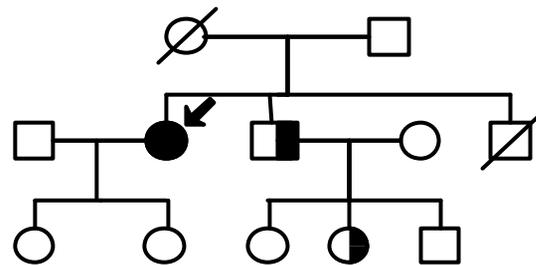


1- Familias con la deficiencia de PC:

1.1 Familia n° 180, PC

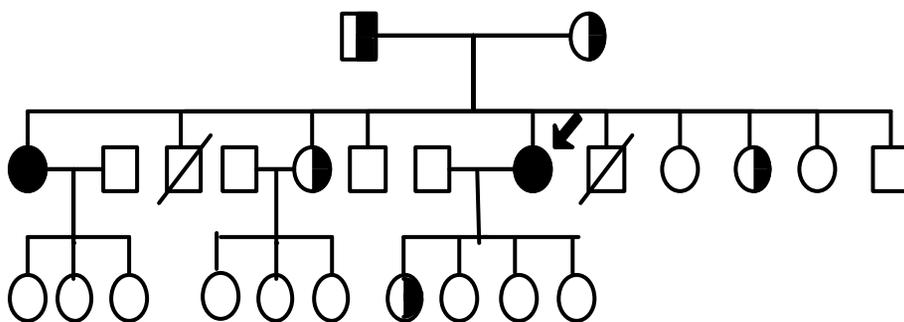


1.2 Familia n° 213, PC

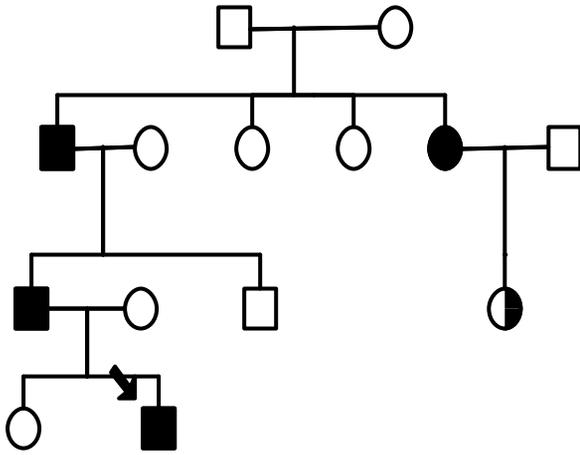


2- Familias con la deficiencia en PS:

2.1 Familia n° 32, PS

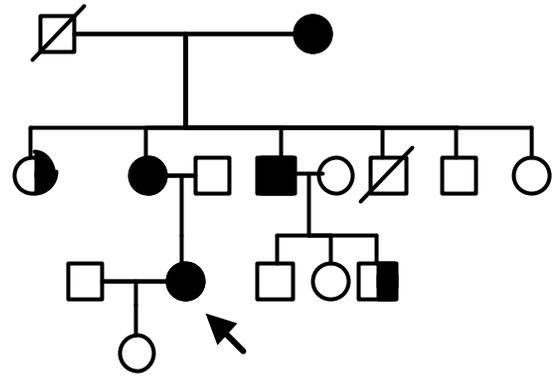


2.2 Familia PS n°1



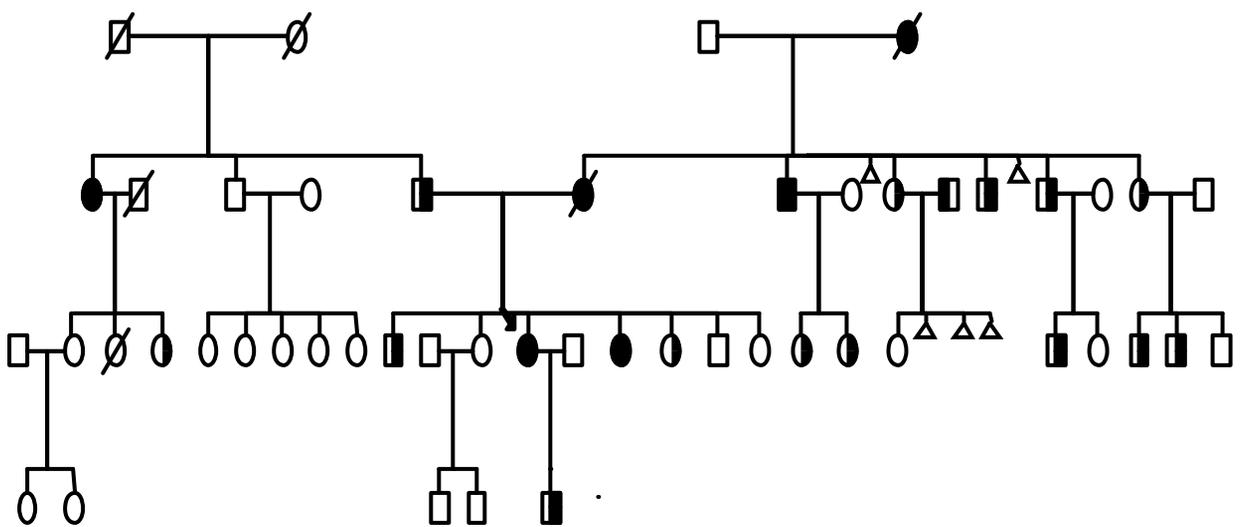
3 Familia de AT

3.1 Familia n° 34, AT

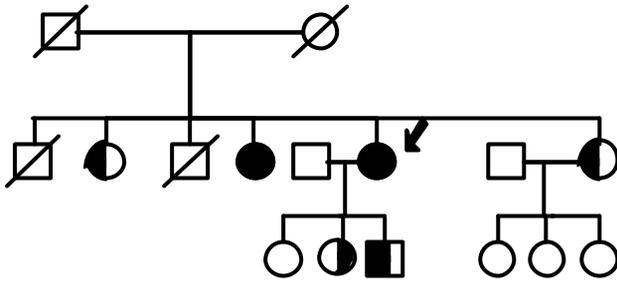


4- Familias con FVL

4.1 Familia n° 7, FVL

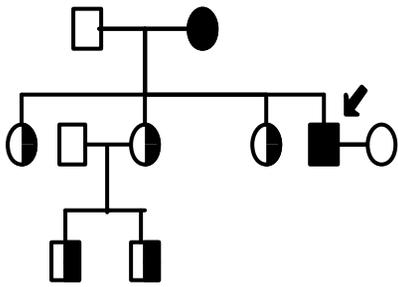


4.2 Familia n° 97, FVL

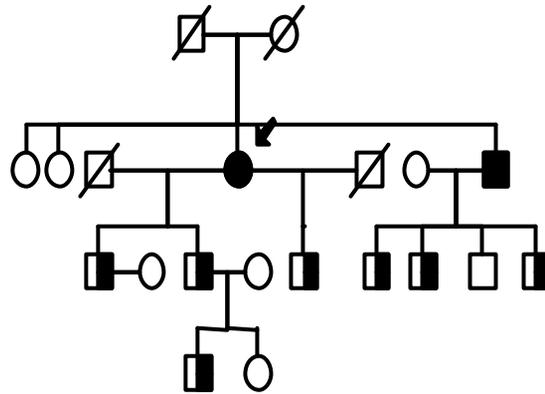


5. Familias con PT20210A

5.1 Familia n° 15, PT20210A



5.2 Familia n°16, PT20210A



1.3 Familias con trombofilia idiopática

En este grupo se incluyeron 21 familias como parte del proyecto GAIT, coordinado por nuestra Unitat d'Hemostàsia i Trombosi del Hospital de Sant Pau de Barcelona (Souto *et al.*, 2000a). En el estudio se seleccionaron 12 familias en el grupo de familias con trombofilia idiopática y 9 familias control (tabla 6) donde los criterios de inclusión fueron los siguientes:

Criterios de inclusión:

- Todas las familias tenían como mínimo 10 individuos repartidos en 3 o más generaciones.
- Las familias con trombofilia se seleccionaron a través de un *propositus* que presentaba trombofilia inexplicada: pacientes con clínica trombótica venosa en edad inferior a los 45 años; o pacientes que mostraban trombosis recurrentes; o pacientes con un episodio de trombosis espontánea con historia trombótica familiar. La trombofilia del *propositus* se consideró idiopática por exclusión previa de las causas biológicas conocidas de trombofilia durante el período de reclutamiento (de 1995 a 1997). En el estudio se descartaron las deficiencias de AT, de PC, de PS, de plasminógeno, la presencia de RPCa, la presencia de anticoagulante lúpico, anticuerpos antifosfolípidos o de disfibrinogenemia. Estos factores de riesgo tampoco estaban presentes en ninguno de los familiares con trombosis.
- Las 9 familias control se seleccionaron con los mismos criterios de tamaño, de entre la población general y de forma aleatoria.

El reclutamiento de los miembros de las familias se realizó fundamentalmente en Barcelona, aunque se completó con individuos emparentados y residentes en Lleida, Tarragona, Córdoba, Málaga y Cádiz. La muestra incluía 397 individuos que se analizaron (186 varones y 211 mujeres). En estas familias, 40 individuos habían padecido uno o más eventos de trombosis venosa, con una edad media de la primera trombosis de 39.7 años. La clínica más frecuente era la trombosis venosa profunda un 52%, en segundo lugar tromboflebitis superficial con un 26% seguido del tromboembolismo pulmonar en un 17 % y un 5% otras localizaciones.

Tabla 6. Distribución, por tipo de familia, de los individuos examinados en el grupo de familias del proyecto GAIT.

Nº de familia	Nº de individuos	Varón	Hembra	Tipo de familia
1	21	15	7	Control
2	27	14	13	Control
3	22	10	12	Control
4	15	6	9	Control
5	14	3	11	Control
6	24	10	14	Control
7	17	11	6	Control
8	22	7	15	Control
9	20	9	11	Control
10	21	15	6	Trombofilia
11	38	19	19	Trombofilia
12	13	5	8	Trombofilia
13	11	6	5	Trombofilia
14	10	6	4	Trombofilia
15	33	10	23	Trombofilia
16	20	10	10	Trombofilia
17	14	5	9	Trombofilia
18	13	8	5	Trombofilia
19	14	7	7	Trombofilia
20	18	7	11	Trombofilia
21	9	3	6	Trombofilia
Total	397	186	211	9 Controles 12 Trombofilia

1.4 Datos clínicos recogidos en los estudios

Los datos clínicos de todos los individuos de los diferentes estudios se recogieron por médicos de la Unidad mediante una entrevista personal.

A todos los individuos del estudio de asociación caso-control se les recogió un documento de consentimiento informado, firmado tanto por el individuo que se incluía en el estudio como por el médico testigo. Este documento se muestra en la figura número 5.

Por otro lado se diseñó una hoja de recogida de datos tal como se muestra en figura número 6. Estos datos incluían la edad del primer evento trombótico, su localización y los factores de riesgo que podían predisponer a la trombosis venosa (figura nº 6). Se les preguntó si habían sufrido previamente episodios de tromboembolismo venoso y si la respuesta era afirmativa, se recogía los datos sobre el primer episodio.

Se recogía la presencia de historia trombótica familiar, la presencia de trombosis recurrente, la presencia de otras enfermedades (como diabetes, obesidad o dislipemia) y en las mujeres el uso de anticonceptivos orales e historia reproductora. También se recogían los datos de presencia de alguna patología de base o tratamiento farmacológico. Además de los datos personales referentes a la edad, al sexo y la zona geográfica.

En el estudio de familias con algún factor genético conocido, había familiares con trombosis, en los que la información clínica se obtuvo con un cuestionario similar al utilizado por Frezzato *et al.* (Frezzato *et al.*, 1996). En los casos de episodios trombóticos no confirmados objetivamente se consideró trombosis si se había dado tratamiento anticoagulante o si se habían detectado signos y síntomas de síndrome postflebítico. El diagnóstico de la trombosis venosa de las extremidades inferiores se objetivó por ultrasonografía o por flebografía. El embolismo pulmonar se diagnosticó por gammagrafía de ventilación-perfusión o angiografía. La trombosis en lugares inusuales se diagnosticaron dependiendo de la localización, con TAC, resonancia magnética, examen oftalmológico, o como hallazgos quirúrgicos.

Para el almacenamiento de todos los datos clínicos y biológicos se diseñó una extensa y completa base de datos mediante el programa *MS Access 97*, para posteriormente poder hacer las consultas necesarias y poder traspasar la información al programa de procesos de análisis estadísticos *SPSS 10.0* o bien al programa de diseño de árboles familiares *Cyrillic 2.1*.

La base de datos incluía los siguientes apartados: los datos personales, los datos referentes a la clínica trombótica, los datos de los estudios familiares, los resultados de los análisis de proteínas y genéticos, los datos del almacenamiento y conservación de las diferentes muestras de plasma y de ADN y los datos del diagnóstico clínico y biológico. En la figura nº 5 (página 83) se muestra el documento del consentimiento informado y en la figura nº 6 (página 84) la hoja de recogida de datos de cada uno de los individuos que participaron en el estudio caso-control.

Figura número °5. Documento del consentimiento informado.

<p>Nombre del sujeto en estudio</p> <p>_____</p> <p>DNI: _____</p> <p>Nombre del padre, tutor o representante legal: (para menores de edad):</p> <p>_____</p> <p>DNI: _____</p> <p>Acepto participar en el estudio sobre las causas genéticas de la enfermedad tromboembólica. Esta investigación se desarrolla conjuntamente por la Unitat de Hemostàsia i Trombosi del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona y por el Department of Genetics de la Southwest Foundation for Biomedical Research (SFBR) de San Antonio, Texas, USA.</p> <p>La Unitat de Hemostàsia i Trombosi del Hospital de la Santa Creu y la SFBR garantizan la confidencialidad de todos los datos clínicos y biológicos relativos a mi persona. Ambas instituciones se comprometen a utilizar las muestras biológicas exclusivamente en investigación científica.</p> <p>Por el presente consentimiento informado autorizo el estudio analítico de mi sangre y ADN para los fines anteriormente mencionados</p> <p>Firmado (el sujeto de estudio o representante legal)</p> <p>Firmado (médico testigo, en representación de las Instituciones Investigadoras)</p> <p>Fecha:</p>

Figura nº 6. Hoja de recogida de datos

Unidad de Hemostasia y Trombosis



HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Hoja Recogida Datos. ETE

Cód paciente: (Nº HC San Pau) **Propósitos** **Familia** **Control**

Cód familia: **Cohorte:** SI NO

Apellidos: **Nº HC propositus:**

Nombre: **Parentesco:**

Dirección:

Teléfono: **Sexo (H/M):** **Fecha de nacimiento:**

Hospital de referencia: **Fecha recogida datos:**

Factores de riesgo vascular

Tabaquismo

Dislipemia

HTA

Diabetes

Anticonceptivos orales Pasado Si No
Presente Si No

Marcas

Duración total del tratamiento (meses)

Relación con ETE Si No

Tiempo de tratamiento hasta el ETE (meses)

Otros antecedentes patológicos remarcables

Neoplasia Tipo

Sde mielop crónico

Tto hormonal

Enf autoinmune

Insuficiencia cardiaca

Obesidad morbida

Sde nefrótico

Vasculitis

Enf inflam intestinal

Otros:

Nº Embarazos: Hº Familiar ETE Si No ??

Nº Abortos 2,3 trim:

Episodios trombóticos									
NºETE	Edad	Territ.	Localización	S	T	Tratamiento	C	Diagnóstico	Circ. asociadas

Diagnóstico biológico

Médico

Territorio (V)enoso

- 1 TVP proximal iliocava
- 2 TVP proximal femoroiliaca
- 3 TVP proximal femoropoplítea
- 4 TVP proximal poplítea
- 5 TVP distal
- 6 TVP global
- 7 TVP local. desconocida
- 8 TEP aislado
- 9 Tromboflebitis superficial
- 10 TVP de miembros superiores
- 11 Visceral eje espleno-portal
- 12 Visceral mesentérica
- 13 Visceral renal
- 14 Senos intracraneales
- 15 Otros

Territorio (A)rterial

- 16 AVT TIA
- 17 AVC RIND
- 18 AVC establecido
- 19 AVC progresivo
- 20 AVC retiniano
- 21 Coronario angor inestable
- 22 Coronario IAM
- 23 Visceral mesentérica
- 24 Visceral renal
- 25 Extremidades
- 26 Otros

Diagnóstico

- 1 Clínico
- 2 Flebografía
- 3 Eco-doppler
- 4 Pletismografía
- 5 TAC
- 6 RMN

Circunstancias asociadas

- 1 Espontánea
- 2 Bajo tto. anticoagulante
- 3 Cirugía abdominal
- 4 Cirugía ginecológica
- 5 Cirugía ortopédica
- 6 Cirugía general
- 7 Gestación/puerperio
- 8 Tratamiento hormonal
- 9 Anticonceptivos orales
- 10 Sde. nefrótico
- 11 Cateterismo intravascular
- 12 Encamamiento / inmovilizac.
- 13 Enfermedad autoinmune
- 14 Insuficiencia cardiaca
- 15 Paraplejia / parálisis
- 16 Vasculitis
- 17 Neoplasia actual
- 18 Varices
- 19 Hemodiálisis
- 20 Otras

Tratamiento

- 1 Desconocido
- 2 Heparina
- 3 Anticoag. orales
- 4 Trombolítico
- 5 HBPM
- 6 Antiagregantes
- 7 Quirúrgico
- 99 Ninguno

S= ¿Sde. postflebitico 2º? T= ¿TEP 2º? C= ¿Correcto tratamiento? ¿Comentario al dorso?

2. MÉTODOS

1. Determinaciones plasmáticas

Recogida de muestras, conservación.

La sangre se obtenía por punción venosa en un tubo de vidrio siliconado (*Vacutainer, Becton Dickinson* ref 367702) con el anticoagulante citrato trisódico a 0,129 M, en una proporción de 1:9 volumen de citrato y sangre. El intervalo entre la extracción y el procesamiento en el laboratorio no superó más de 2 horas. Para la determinación de las proteínas de la coagulación se obtuvo plasma pobre en plaquetas. Para ello se centrifugó a 3.500 rpm (1600 g) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente el plasma pobre en plaquetas se separaba del botón celular y se analizaba el mismo día o se congelaba a -40°C para ser utilizado antes de 1 mes, o a -80°C para almacenar un tiempo más prolongado.

1.1 Pruebas de coagulación del estudio básico de hemostasia. Se determinaron en un coagulómetro automático (ACL 300; Instrumentation Laboratory; IL): el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) utilizando cefalina bovina y sílica (Instrumentation Laboratory), tiempo de protrombina (PT) con tromboplastina humana (Thromborel S[®]; Berhing) y tiempo de trombina (TT) con trombina bovina (Instrumentation Laboratory). Estas determinaciones se realizaron en todos los pacientes, para poder excluir defectos de la hemostasia o el uso de tratamiento con anticoagulantes.

1.2 Determinaciones funcionales mediante pruebas coagulométricas. El fibrinógeno, FII, FVIII, FXII, PS funcional y la Resistencia a la PC activada (RPCa), se analizaron en el coagulómetro automático STA (Roche). El anticoagulante lúpico y tiempo de tromboplastina medido por la trombomodulina se analizó en el KC-10 (Amelung).

-Fibrinógeno: se determinó por el método de von Clauss (Clauss 1946) con trombina bovina de BioMerieux (Marcy-l'Etoile). La expresión de resultados en g/l. Rango de referencia 2-4 g/l.

-FII: se analizó utilizando plasma deficiente en FII de Diagnostica Stago (Asnières). Se medía el tiempo de coagulación en presencia de tromboplastina cálcica (Thromborel S[®] de Behring) y

plasma deficiente en FII. Así se produce un sistema donde todos los factores están presentes en exceso, a excepción del FII, que lo aporta el plasma diluido del individuo (Caen J *et al.*, 1975). Los resultados se expresaron en % y el rango de referencia para el FII era: 125-70%.

-FVIII y FXII: se determinó el tiempo de coagulación en presencia de plasma deficiente en FVIII o en FXII respectivamente (Diagnostica Stago), de cefalina (APTT silica IL para FVIII y PTT-Reagent de cefalina de conejo y kaolin para FXII de Diagnostica Stago) y Ca^{2+} (Calcium Chloride Solution IL). Es un sistema donde todos los factores están presentes en exceso a excepción del FVIII o FXII que lo aporta el plasma diluido del individuo (Caen J *et al.*, 1975).. Los valores de nuestro laboratorio se expresaron en % y los valores de referencia eran para el FVIII de 45-175% y para FXII 40-185%.

-PS funcional: se analizó el tiempo de coagulación en presencia de Ca^{2+} de un sistema que contenía todos los factores excepto la PS que aportaba el plasma diluido del individuo y que estaba enriquecido con FVa y PC activada (Kit Proteína S Clotting-Test de Diagnóstica Stago) (Wolf *et al.*, 1989). El rango de normalidad era de 71% a 142% y en el caso de mujeres jóvenes (<46 años) de 62% a 111%.

-Resistencia a PC activada: se determinó de acuerdo con el test descrito por Dahlbäck *et al* (Dahlbäck *et al.*, 1993) con el kit Coatest APCTM Resistance de Chromogenix (Möln dal, Sweden), que contiene proteína C activada con CaCl_2 y un reactivo de TTPA con fofolípidos purificados, con silica coloidal como activador de contacto. Los resultados se expresaban mediante la razón de la TTPA en presencia de proteína C activada (PCa), respecto a la TTPA sin PCa. La razón (rPCa) inferior a 2,08 se consideraba como resistencia a la PCa.

-Anticoagulante lúpico: se determinó mediante el método de Exner (Exner *et al.*, 1978). Es el tiempo de coagulación obtenido al añadir una alta concentración de caolín y CaCl_2 (Behring), que desencadena la vía intrínseca de la coagulación a través de la activación del Factor XII, en una mezcla de plasma control y plasma problema a diferentes proporciones. La base teórica es que la presencia de anticuerpos antifosfolípidos del plasma problema pueden inhibir los

fosfolípidos de un plasma control y alargar el tiempo de TTPA. El resultado es positivo si la curva de los tiempos de coagulación respecto a la concentración de plasma del paciente es convexa en la zona de menor proporción de plasma problema.

-Tiempo de tromboplastina mediado por la trombomodulina: en nuestro laboratorio se desarrolló un nuevo método de medir la capacidad procoagulante del plasma. Este método consistía en un tiempo de protrombina en presencia y ausencia de trombomodulina (Borrell *et al.*, 2002).

Los reactivos utilizados en esta determinación eran por un lado el tampón de Owren (Diagnostica Grifols), la trombomodulina (American Diagnostica) y por otro el reactivo para el análisis del tiempo de protrombina, el Thromborel S[®] de Dade Behring preparado según las instrucciones del fabricante. Lubrol PX Sigma. Solución A: compuesta de dos partes de Thromborel S[®], 1 parte de trombomodulina (30 U/ml) y una parte del tampón de Owren. Solución B: era similar al A sin trombomodulina que se sustituyó por su disolvente: tampón 0,02M Tris, 0,1 M NaCl pH 7,4. 0,05% lubrol PX, y 0,02 % de azida sódica.

El método consistía básicamente en determinar el tiempo de coagulación del plasma del paciente en presencia de trombomodulina (solución A) y en ausencia de la misma (solución B). Los resultados se expresaron como:

-R1: la razón entre el tiempo de coagulación del plasma del paciente respecto al tiempo de coagulación del plasma del control utilizando el reactivo A.

-R2: la razón entre el tiempo de coagulación del plasma del paciente entre el tiempo de coagulación del plasma control utilizando el reactivo B.

-R3: la razón obtenida entre R1/R2.

Los rangos normales obtenidos de un grupo de controles sanos eran para R1 de 0,74-1,31 y para R2 de 0,85-1,23, los cuales se calcularon con los percentiles del 5%-95%. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y los coeficientes intra e interensayo se estimaron entre un 2-6%.

1.3. Determinaciones mediante substratos cromogénicos. AT y PC fueron medidos mediante un autoanalizador bioquímico (CPA Coulter, Miami, USA) mediante métodos cromogénicos de Chromogenix (Mölndal, Sweden).

- **AT:** se utilizó el kit comercial Comatic LR Antithrombin Chromogenix (Möndal, Sweden) donde el plasma problema se incubaba con un exceso de FXa y en presencia de heparina (Odegard *et al.*, 1975). Mediante un substrato cromogénico se medía la cantidad de FXa residual, que era inversamente proporcional a la concentración de AT inicial presente en la muestra. La determinación requería una calibración con un control de referencia (Unicalibrator, Stago) y los resultados se expresaban en %. El rango de referencia era de: 80% -100%. Si el resultado era inferior al límite de referencia se determinaba la AT antigénica.

- **PC amidásica:** se utilizó el kit comercial Coamatic Protein C (Chromogenix), donde el plasma problema se incubaba con un exceso de un activador de la PC (veneno de serpiente *Agkistrodon contortrix*). Mediante un substrato cromogénico (S-2366) se podía medir la cantidad de PC activada producida, que era directamente proporcional a la concentración de PC inicial de la muestra (Stockner *et al.*, 1986). La curva de calibración se determinaba mediante un calibrador (Unicalibrator, Stago) y se medía en %. El rango de referencia de nuestro laboratorio era entre 70%-130%. Si el valor obtenido resultaba inferior al valor de la normalidad se determinaba la PC antigénica.

1.4. Análisis tipo enzima inmunoensayo (ELISA).

- **PS Total, PS libre y PC antigénicas:** se utilizaba un método basado en la insolubilización de un anticuerpo monoclonal antiproteína (ej. Anti-PS libre) en los pozos de una placa de poliestireno. El procedimiento consistía en incubar el plasma del paciente (con proteína ej. PS libre) y después se añadía un 2º anticuerpo antiproteína (ej anti-PS libre) marcado con un enzima, como por ejemplo, peroxidasa. Este enzima rompía el substrato ortofenildiamina (POD), añadido posteriormente, dando un color que se podía cuantificar en el espectrofotómetro y que era proporcional a la concentración de proteína (ej. PS libre) presente en el plasma. En este grupo estaban las determinaciones de PS total, PS libre (Asserachrom PS total y PS libre, Stago, France) y la PC antigénica (Asserachrom proteína C, Stago, France) (Johustone y Thorpe 1985). Los resultados se expresan en % y el rango normal era de 73% a 124% para la PS total, y de 72% a 140% para la PS libre. En mujeres jóvenes (<46 años) los niveles normales disminuían hasta un

63% para la PS total y a un 54% para la PS libre. En el caso de la PC antigénica era de un 70% a 130% y su determinación sólo se llevaba a cabo en el caso de que las pruebas funcionales dieran por debajo del rango de normalidad.

- **Determinación del vWF:** (Johustone y Thorpe 1985) método de ELISA, pero en este caso se utilizó un método de anticuerpos policlonales (Dako) para su análisis. El vWF se expresaba en tanto por ciento a través de una curva de calibración con el estándar internacional (*4th International Standard for FVIII and vWF*). El rango de normalidad en nuestra población era entre un 55%-150%.

- **Determinación de anticuerpos antifosfolípidos:** método utilizado según Gharavi (Gharavi *et al.*, 1987). Fundamentalmente se basaba en la insolubilización del antígeno a determinar (ej. cardiolipina, fosfatidilserina, ...) en los pozos de una placa de poliestireno (placas ELISA Costar Serocluster). Se incubó el plasma problema (diluido en suero bovino adulto que es rico en β_2 -glicoproteína-I), que aportaba los anticuerpos, en caso de tenerlos (ej. tipo IgG anticardiolipina) y se añadía un 2º anticuerpo marcado con peroxidasa de conejo (Dako) (ej. anti IgG humano marcado con peroxidasa). Este enzima rompía el substrato ortofenildiamina (Sigma) dando un color que se podía cuantificar en un espectrofotómetro a 492 nm y que era proporcional a la concentración de anticuerpo (ej. IgG anticardiolipina) en el plasma.

Con este método (Gharavi *et al.*, 1987) se analizaron los anticuerpos antifosfolípidos del tipo IgG y IgM antifosfatidilserina (aFS) y anticardiolipina (aC) y se utilizó la fosfatidilserina y la cardiolipina (Sigma) como antígeno respectivamente.

Los resultados se calcularon mediante una fórmula que calculaba el índice de unión (A):
P: lectura muestra problema, B: lectura del blanco y CN: lectura del control negativo.

$$A = \frac{P - B}{CN - B}$$

Valores normales: anticardiolipina tipo IgG <2,7; anticardiolipina tipo IgM <3,0
antifosfatidilserina tipo IgG <2,7; antifosfatilserina tipo IgM <3,6.

-Determinación de anticuerpos tipo anti- β_2 -Glicoproteína-I IgG y IgM: se determinó mediante el kit comercial de Diamedix (Miami, FL). El procedimiento se basaba que en la placa de ELISA contenía β_2 -Glicoproteína-I humana purificada. Se incubaba el plasma problema y calibradores que incluía el kit. Si estaban presentes los anticuerpos anti- β_2 -Glicoproteína-I se unían al antígeno formando así un complejo antígeno-anticuerpo. Seguidamente se añadía un anticuerpo anti-IgG o anti-IgM humano conjugado, marcado con peroxidasa. Este enzima rompía el substrato dando un color que se podía cuantificar la absorbancia en el espectrofotómetro a 492 nm y era directamente proporcional a la concentración de anticuerpos anti- β_2 -Glicoproteína-I tipo IgG o IgM presentes en la muestra. Los valores se calculaban mediante una curva de calibración. Los valores de referencia en nuestro laboratorio eran: anti- β_2 -Glicoproteína-I tipo IgG <10 u/ml; anti- β_2 -Glicoproteína-I tipo IgM <5 u/ml.

1.5. Electroinmunoensayo: técnica aplicada para la determinación de la **AT antigénica** la cual consistía en hacer correr una muestra en un campo eléctrico (Laurell 1972). El soporte era una placa de agarosa al 1% (Tipo I Low EEO de Sigma) que se preparaba y se le añadía anticuerpo anti-AT (Dako) y heparina. Debido al pH del tampón la antitrombina migra hacia el ánodo, mientras que el anticuerpo se mantenía estacionario. El antígeno (AT) y el anticuerpo (anti-AT) forman complejos que precipitan cuando llegan a la proporción de equivalencia, formando un pico bien definido. La altura de este pico, en milímetros, era proporcional a la concentración AT. Para la visualización de la electroforesis se procedía a una tinción de la placa con colorante (*Comassie Brilliant Blau*). Se analizaba con una curva de calibración con el correspondiente calibrador y los resultados se expresaban en %. El rango de normalidad era entre un 80-120%. La determinación de la AT antigénica se llevó a cabo cuando la funcional resultaba anormal.

En general, todos los rangos de referencia de normalidad de nuestro centro se obtuvieron a partir del análisis de 100 controles sanos, donantes de banco de sangre, y expresados como la media \pm 2SD o los percentiles 95%-5%, en función de la proteína. El criterio para el diagnóstico de déficit de la proteína era que los niveles plasmáticos debían ser inferiores al límite de

normalidad en al menos 2 muestras diferentes. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo eran generalmente estimados entre un 2% y 6%.

2. Análisis genéticos

Recogida de muestra. La muestra de ADN se obtuvo de leucocitos de sangre periférica. En primer lugar se obtenía la sangre periférica por punción venosa y se recogía en un tubo de vidrio siliconado con EDTA al 7,5% (Vacutainer, Becton Dickinson ref. 367702) o bien citrato trisódico a 0,129M en una proporción de 1 volumen de citrato por 9 volúmenes de sangre. La cantidad total recogida para cada individuo fue de 5 a 20 ml de sangre periférica. Después se siguió con los protocolos de lavado de eritrocitos y extracción del ADN de leucocitos por el método *Salting out procedure* (Miller *et al.*, 1988). Una vez obtenida la muestra del ADN se conservó a 4°C o se congeló indefinidamente a -20°C.

2.1. Lavado de la sangre y lisis de los eritrocitos.

En primer lugar se procedió al **lavado de la sangre total** con suero fisiológico para conseguir separar el tapón celular (formado por eritrocitos, leucocitos y plaquetas) del plasma de la muestra de sangre. Para ello se mezcló toda la sangre en un tubo cónico con suero salino fisiológico (Braun) hasta un volumen final de 50 ml. Se centrifugó a 2.800 rpm durante 10 minutos, a 4°C y sin freno. Se descartó el sobrenadante conservando el tapón celular.

Seguidamente se procedió al proceso de **lisis de eritrocitos** con el objetivo de obtener un tapón celular formado por leucocitos. Para ello se mezcló el tapón celular obtenido en el proceso anterior con el tampón de lisis de eritrocitos (ver reactivos página 93) hasta un volumen final de 50 ml. La mezcla se mantenía en un baño con hielo durante 20-30 minutos. Se centrifugó a 3.000 rpm, durante 15 minutos a 4°C y sin freno y seguidamente se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso hasta obtener un tapón de leucocitos limpio (normalmente 2-3 lavados). Se congeló el precipitado a -20°C o se continuó con la extracción del ADN.

2.2 Extracción del ADN : 2.2.1 Método *Salting out procedure*: La extracción de ADN se realizó mediante el método de precipitación de proteínas con cloruro sódico, llamado *Salting out Procedure* (Miller *et al.*, 1988):

1- Lisis de leucocitos: se procedió a la lisis del tapón de leucocitos mediante la mezcla del tampón de lisis de leucocitos (ver reactivos página 93), SDS al 10% (dodecilsulfato sódico, SERVA) como detergente y una solución de trabajo de proteinasa K a 2 mg/ml (ver reactivos página 93). En primer lugar se lisaba el tapón de leucocitos con el tampón de lisis de leucocitos (6 ml) y seguidamente se añadía el SDS (0,4 ml) y la proteinasa K (1 ml) o aumentando las cantidades de manera proporcional en función del tamaño del tapón de leucocitos. Se mantenía en agitación suave durante 16 horas a una temperatura de 37°C.

2- Precipitación de proteínas: para poder eliminar las proteínas no deseadas se utilizó el método de precipitación con NaCl (Merck) sobresaturado a 5,5M. Se añadía 1 ml de NaCl 5,5M o la cantidad proporcional necesaria y se agitaba 15-30 segundos hasta obtener una emulsión completa. Se centrifugaba a 3.400 rpm 15-20 m a 4°C, se recuperaba el sobrenadante sobre otro tubo cónico y se repetía el proceso hasta que no quedaban restos de sales de NaCl (normalmente 3 veces).

3- Precipitación del ADN: para conseguir la precipitación del ADN se añadió 2 volúmenes ($V=20$ ml en el caso de 6 ml de lisis de leucocitos) de etanol absoluto (Merck). Seguidamente se agitó de forma suave hasta que se observó la formación del precipitado del ADN en forma de medusa. Se recogía el ADN con una pipeta tipo Pasteur de vidrio estéril y por inmersión en etanol al 70% se eliminaban los restos de sales. El precipitado de ADN se recogía en el volumen necesario (0,5-3 ml) de TRIS/EDTA 10 mM/ 0,2 mM (ver reactivos, pág. 93). Se dejaba en agitación suave 1 hora a 37°C y después a 4°C hasta que el ADN estaba totalmente disuelto.

Lectura de la concentración: se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a una densidad óptica (DO) de 260 nm (DO_{260}), que correspondía al ADN bicatenario presente en la muestra y a DO de 280 nm (DO_{280}) que correspondía a la concentración de proteínas que podían quedar de remanente en la muestra. Se comprobaba la pureza de la muestra determinando la razón:

$$DO_{260}/DO_{280} (1,6 < \text{razón} < 2)$$

La razón óptima varía entre 1,6-2. Una razón inferior a 1,6 indica contaminación de proteínas y si es superior a 2 posibles restos de sales en la muestra.

Cálculo de la concentración del ADN: la concentración de ADN se calcula mediante la lectura a DO_{260} teniendo en cuenta la dilución realizada en la muestra de lectura (1/50) y el coeficiente de extinción molar para el ADN bicatenario:

$$\mu\text{g/ml de ADN} = DO_{260} \times 50 \times 50 *$$

* factor derivado del coeficiente de extinción molar para el ADN bicatenario.

Reactivos y soluciones de trabajo:

- Suero fisiológico BRAUN. Solución isotónica de cloruro sódico al 0,9% (500 ml).
 - Tampón de lisis de eritrocitos: se ajusta con HCl a pH 7,5
 - Tris HCl 20 mM (Tris: hidroximetil-aminometano; HCl: ácido clorhídrico, Merck).
 - MgCl₂ 5mM (Cloruro de Magnesio, Merck)
 - Tampón de lisis de leucocitos: se ajusta pH a 8,2 con HCl
 - Tris (Merk) 0,01M
 - NaCl (Cloruro sódico) (Merck) 0.4M
 - EDTA (Etilendiaminotetracético Merck) 2mM

 - Proteinasa K:
 - Proteinasa K (Roche) 2mg/ml.
 - SDS 1%.
 - EDTA 2mM
 - Tris-EDTA 10mM/0,2mM:
 - Tris (Merk) pH 7,5; 10mM
 - EDTA (Merck) 2mM
-

2.2.2 Extracción rápida

Método realizado con el *kit* de QIAamp DNA de Qiagen (IZASA), Ref: 50951106.

Procedimiento : Se prepararon alícuotas de 200 μ l de sangre total de las muestras de sangre periférica y se mezcló con 20 μ l de proteasa. Seguidamente se procedió al lavado de la sangre al añadir el Buffer AL, con el que se incubaba las muestras a 56°C durante 10 minutos para llevar a cabo la lisis celular. Finalmente se obtenía la precipitación del ADN al añadir 200 μ l de etanol 96° (Merk). Se lavaba la mezcla al pasarla por una columna suministrada por el fabricante y se añadía 500 μ l Buffer AW1 y se centrifugaba. Se añadía 500 μ l de Buffer AW2 y se centrifugaba. Finalmente se desechaba el tubo contenedor y se ponía un tubo Eppendorf con 200 μ l de Buffer AE que era el tampón que eluía la muestra de ADN y se incubaba 5 min. a temperatura ambiente y después 30 min. a 37° C para la correcta disolución del ADN.

Preparación de Reactivos: Proteasa Qiagen: 110 mg de producto Qiagen; Proteasa 5.5 ml; Buffer AW1: 95ml AW1 Concentrado y 125ml etanol 96° ; Buffer AW2: 66 ml AW2 Concentrado y 160 ml etanol 96° .

2.3 Detección de mutaciones.

Algunos de los marcadores genéticos se estudiaron mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *polymerase chain reaction*), seguido de un análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) o por posterior secuenciación, cuando se requería.

La técnica de la PCR se basa en la amplificación selectiva de regiones específicas de ADN *in vitro* (Saiki *et al.*, 1988) y consiste en sucesivos ciclos de desnaturalización, hibridación a oligonucleótidos específicos (cebadores) complementarios al extremo 5' de cada hebra, y extensión de la cadena de ADN mediante la acción de la *Taq* polimerasa (Ecogen). Se realizó en un termociclador el 9700 (Applied Biosystems).

Cada fragmento de ADN que queremos analizar muestra unas características que inciden sobre distintas variables del proceso. Por lo tanto, es preciso optimizar las condiciones para cada fragmento en particular. Los parámetros que más frecuentemente se pueden variar en el termociclador 9700 (Applied Biosystems) son la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos y el tiempo de extensión. La temperatura de hibridación (T) depende de la

secuencia del oligonucleótido específico y se calcula en °C mediante la fórmula siguiente:

$$T = [4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)] - 4$$

Para cada oligonucleótido, si las temperaturas son muy dispares se usa la más baja. Si son semejantes, el resultado de la suma de ambas temperaturas se divide por dos. El tiempo de extensión depende de la longitud del fragmento a amplificar y se calcula sobre la base de la relación 1 min/kb.

Condiciones particulares:

En la amplificación, para la determinación de la presencia de las diferentes mutaciones analizadas, se utilizaron preferentemente los oligonucleótidos descritos en la bibliografía. Sin embargo, teniendo en cuenta las diferentes técnicas en que se utilizó la técnica de la PCR (RFLP, secuenciación, PCR de mutagénesis y PCR en tiempo real), se diseñaron otros oligonucleótidos para determinados casos. En la tabla 8 se muestran todos los oligonucleótidos que se utilizaron en cada uno de los protocolos.

Las condiciones óptimas de PCR :

1- Para la determinación de la mutación FVL y la mutación PT20210A: 50 µl de volumen final, conteniendo 20 mM Tris HCl a un pH de 8,2, 2mM MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleótido 5' trifosfato (dATP: 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato; dTTP: 2'-deoxitimidina 5'-trifosfato; dGTP: 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato; dCTP: 2'-deoxicitidina 5'), 0,5 µM de cada oligonucleótido, 250 ng de DNA y 0,5 U de Taq polimerasa (Bioline, Cultek) .

2- Las mutaciones FVL y la PT20210A también se determinaron en uno de los estudios con un método de PCR múltiple optimizando así las determinaciones. En este caso se llevo a cabo en 50 µl de volumen final, conteniendo 20 mM de Tris-HCl, a un pH de 8,2, 2 mM de MgCl₂ y 0,2 mM de cada desoxinucleótido 5' trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,5 µM de cada oligonucleótido, 250 ng de DNA, y 1,5 unidades de Taq-gold (Applied Biosystems, Norwalk, CT).

3- Para la determinación de la mutación C46T del gen del FXII y el polimorfismo A4070G del gen del FV: 25 ml de volumen final, conteniendo 3mM MgCl₂, 20 mM TRIS HCl a pH 8,2, 0,4 mM de cada deoxinucleótido 5' trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 μM de cada oligonucleótido, 200 ng de DNA y 0,5 U de Taq polimerasa (Promega) .

4- Para la genotipación del grupo sanguíneo ABO: en un volumen final de 25 μl, conteniendo 20 mM Tris HCl a un pH de 8,2, 2mM MgCl₂, conteniendo 0.4 mM de cada oligonucleótido, 200 ng de ADN , 0,4 mM de cada deoxinucleótido 5' trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,5 U Taq polimearasa (Bioline, Cultek).

Procedimiento general:

1. Primero se atemperaban las muestras de ADN a temperatura ambiente incluyendo los controles.
2. Se descongelaban los reactivos y se preparaba la mezcla de reacción.
3. Se preparaba las tiras o placas de los tubos de 0,2 μl para la PCR 9700.(Applied Byosistems).
4. Seguidamente se añadía la mezcla de reacción de PCR a cada una de las muestras de pacientes, control portador heterocigoto o control homocigoto y el control interno de la PCR (H₂O).
5. Se cargaba la PCR y ponía en marcha el programa de amplificación correspondiente.
6. Al finalizar la reacción de amplificación de la PCR y se paraba la reacción a 4°C.

Procedimientos específicos:

2.3.1. Detección de la mutación Factor V Leiden (FVL; Arg⁵⁰⁶→Gln).

Fue analizado mediante el uso de dos oligonucleótidos, el FV1 y el FV2 (Bertina *et al.*, 1994; Kooleman *et al.*, 1994) mostrados en la tabla 8.

Programa del termociclador:

5'	95°C	
40"	95°C	}
40"	55°C	
2'	72°C	
5'	72°C	x 30 ciclos

Control de amplificación: en un gel al 1,5% de agarosa NMP (Normal Melting Point, FMC, Bioproducts) se visualizaba el fragmento amplificado de 220 pb. El análisis de RFLP: el fragmento de 220 pares de bases se digirió con el enzima *MnlI* (New England Biolabs) durante 16 horas. Se analizó después mediante una electroforesis en un gel al 3% de agarosa tipo Nusieve (FMC Bioproducts) y visualizado con bromuro de etidio.

En el fragmento amplificado existen 2 dianas para el enzima *MnlI* y cuando el paciente presenta la mutación 1691A, se produce la pérdida de una de las dianas para este enzima y varia el patrón de bandas.

Patrón de bandas de la digestión:

Alelo normal G ----- 37/67/116 pb (3 bandas).
Alelo mutado A ----- 67/ 153 pb (2 bandas).

La reacción tenía que ser completa y se apreciaba comparando la carrera del gel con los controles conocidos con un patrón heterocigoto y un homocigoto normal para confirmar la total digestión.

2.3.2 Detección en el gen de la protrombina de la mutación PT20210A.

El fragmento de 345 pb va desde el exón 14 a la región del extremo 3'-UT. Se amplificó mediante los oligonucleótidos descritos por Poort *et al* (Poort *et al.*,1996), mostrados en la tabla 8. La amplificación se llevó a cabo con un oligonucleótido reverso mutagénico (Pr95-315, ver tabla 8). Con este cambio se introducía una diana para el enzima de restricción *Hind III* (-A/AGCTT-) (Life Technologies Inc. USA) en el fragmento amplificado del alelo menos frecuente, A₂: AAG (PT20210A).

Programa del termociclador:

5' ... 95°C
 40" ... 95°C
 40" ... 55°C
 2' ... 72°C
 5' 72°C

} x 30 ciclos

Control de amplificación: se llevó a cabo en una agarosa 1,5 % NMP (FMC Bioproducts) para poder visualizar el fragmento de 345 pb. Análisis de RFLP: El fragmento de PCR se digirió con la endonucleasa *Hind III* y se analizó después de una electroforesis de un gel de agarosa de Nusieve al 3% (FMC Bioproducts). En el fragmento amplificado se generaba una diana para la enzima en el caso del alelo mutado, el menos frecuente (A_2 :AAG) introducido a través de la amplificación con el oligonucleótido mutagénico y ninguna diana en el alelo normal (A_1 : GAG).

Patrón de bandas de la digestión:

Alelo normal G ----- 345 (1 bandas). Alelo mutado A ----- 322/23 (2 bandas).

2.3.3 Detección múltiple de las mutaciones FVL y PT20210A

Fueron analizadas mediante el uso de los oligonucleótidos: FVA, FVB, PTH1 y PTH2 (Ripoll *et al.*, 1997) mostrados en la tabla 8.

Programa del termociclador:

5' 95°C
 1"95°C
 1' 55°C
 1' 72°C
 10 72°C

} x 40 ciclos

Control de amplificación: llevado a cabo en un gel al 1,5% de agarosa NMP (FMC, Bioproducts) donde se visualizaban los 2 fragmentos amplificados de 175 pb (para PT20210A) y 118 pb (FVL). El análisis de RFLP: los fragmentos de 175 y 118 pares de bases se digerían con

el enzima *TaqI* (Biolabs) durante 16 horas y se analizaban después de una electroforesis de un gel agarosa de Nusieve al 3% (FMC Bioproducts, Rockland, ME) y visualizado con bromuro de etidio. Cada uno de los fragmentos amplificados tenían 1 diana para el enzima *TaqI* y cuando el paciente presentaba una u otra mutación existe una pérdida de una de las dianas para este enzima y variaba el patrón de bandas.

Patrón de bandas de la digestión:

Alelo normal en ambos casos ----- FVL 157/18 - PT20210A 98/20 (4 bandas).
 Alelo mutado en ambos casos ----- FVL 175 - PT20210A 118 (2 bandas).

La reacción tenía que ser completa, se apreciaba comparando la carrera del gel con los controles conocidos, un patrón heterocigoto y un homocigoto normal para confirmar la total digestión.

2.3.4 Detección del polimorfismo A4070G del gen *F5*

EL polimorfismo era genotipado utilizando los oligonucleótidos descrito por Bernardi *et al* (Bernardi *et al.*, 1997) que amplificaba la zona del gen *F5* correspondiente.

Programa del termociclador:

4'.....95°C	}	X 30 ciclos
45".....95°C		
45''.....64°C		
45'''..... 72°C		
2'.....72°C		

Control de amplificación: se llevó a cabo en una agarosa 2 % NMP (FMC. Bioproducts) para poder visualizar el fragmento de 703 pb. Análisis de RFLP: El fragmento de PCR se digirió con la endonucleasa *RsaI* (New England, Biolabs) y analizado después de una electroforesis de un gel agarosa de al 2% NMP (FMC Bioproducts). En el fragmento amplificado se generaba una diana para el enzima en el caso del alelo mutado (4070G).

Patrón de bandas de la digestión:

Alelo normal A ----- 703 (1 bandas).
 Alelo mutado G ----- 492/211 (2 bandas).

2.3.5 Detección del polimorfismo C46T del gen *F12*

La sustitución de 46 C→T esta localizada a una distancia de 4 bases anteriores al codón ATG (Met) de inicio de traducción. Se amplificó mediante los oligonucleótidos mostrados en la tabla nº8 (Kanaji *et al.*, 1998) con modificaciones en las condiciones de reacción.

Programa del termociclador:

5'..... 95°C
 1'..... 95°C }
 1'..... 57°C } X 30 ciclos
 1' 72°C }
 10'..... 72°C
 ∞ 4°C

El control de amplificación se llevó a cabo en un gel al 1% de agarosa NMP (FMC, Bioproducts) para visualizar el fragmento amplificado de 369 pb. El análisis de RFLP se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl de digestión donde se digería el fragmento de 369 pb con enzima *Sfna I* (New England Biolabs) a 37°C durante 16 horas, a diferencia del método de Kanaji *et al* (Kanaji *et al.*, 1998), ya que se obtiene una mejor resolución del patrón de bandas de la digestión, analizado mediante una electroforesis de un gel agarosa NMP (FMC Bioproducts) al 2%. En presencia del polimorfismo C46T en el fragmento amplificado aparece una diana para el enzima de restricción *Sfna I*.

El patrón de bandas de la digestión:

Alelo normal C ----- 369 (1 banda)
 Alelo mutado T -----232/137 (2 bandas)

2.3.6 Determinación del genotipo del grupo sanguíneo del sistema ABO.

La amplificación mediante PCR de los dos fragmentos: uno de 252 pb del exón 6 y otro de 844 pb del exón 7 se llevó a cabo mediante el uso de los oligonucleótidos descritos por Olson 1995 (Olson *et al.*, 1995). La amplificación se llevó a cabo mediante PCR múltiple donde se amplifican los dos fragmentos conjuntamente después de ajustar las condiciones del termociclador y los reactivos necesarios.

Programa del termociclador:

2'.....	94°C	
30''.....	94°C	} X 10 ciclos
1'.....	63°C	
1'.....	72°C	
30''.....	94°C	
1'.....	61°C	} X 25 ciclos
1'.....	72°C	
5'.....	72°C	
∞.....	4°C	

Los fragmentos amplificados de 252 pb y 844 pb fueron digeridos con una mezcla de un volumen final de 10-15 µl con 10 U de cada una de las enzimas de restricción *KpnI* y *MspI* (GIBCO Life Technologies). La digestión se incubaba durante dos horas a 37°C y se visualizaba en una agarosa al 2% NMP (FMC, Bioproducts). El patrón de bandas está mostrado en la tabla 7.

Tabla 7. Patrón de bandas: los patrones de digestión esperados eran los de los 15 genotipos posibles al combinar los alelos A₁, A₂, B, O₁ y O₂. La banda de puntos representa los fragmentos obtenidos después de la amplificación y digestión del exón 6 y las bandas oscuras los obtenidos de la amplificación y posterior digestión del exón 7.

Fenotipo	O			B			A ₂ B	A ₁ B	A ₂			A ₁					
	O ₂ O ₂	O ₁ O ₂	O ₁ O ₁	BO ₂	BO ₁	BB	A ₂ B	A ₁ B	A ₂ O ₂	A ₂ O ₁	A ₂ A ₂	A ₁ O ₂	A ₁ O ₁	A ₁ A ₂	A ₁ A ₁		
Bandas /pb																	
309	—————																
252	- - - - -			- - - - -													
223				—————			—————										
204	- - - - -						—————										
164		- - - - -															
150																	
137	- - - - -			- - - - -			- - - - -										
119	- - - - -			- - - - -			- - - - -						- - - - -				
96		- - - - -															
87		- - - - -															

Tabla 8. Secuencia de los oligonucleótidos específicos (cebadores) y las sondas utilizados en cada uno de los análisis.

ANÁLISIS	Oligonucleótidos	Posición Cambios aa
Factor V Leiden	FV1 5'-TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA-3' FV2 5'-CTTGAAGGAAATGCCCATTA-3'	1691 G→A Exón 10 del gen F5/- Arg506Gln
PT20210A	Pr 93-787: 5'- TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3' Pr 95-315: 5'- ATAGCACTGGGAGCATTGAA* <u>GC</u> -3' ¹	-20210 G→ A -Zona no traducible en 3'
Múltiple: FVL+ PT20210A	FVA: 5'- GCAGATCCCTGGACAGTC-3' FVB: 5'- TGTTATCACACTGGTGCTAA-3' PTH1: 5'-CAATAAAAGTACTCTCA <u>TC</u> -3', ¹ PTH2: 5'-AGGTGGTGGATTCTTAAGTC-3'	-1691 G→A Exón 10 del gen F5/ Arg506Gln. -20210 G→ A -Zona no traducible en 3'
A4070G	FV13A: 5'-CAAGTCCTTCCCCACAGATATA-3' FV13B: 5'- AGATCTGCAAAGAGGGGCAT-3'	4070 A → G exón 13 del gen F5 / His1299Arg
FXII C46T	U1: 5'-CCAGTCCCCTATCTAGAAAAG-3' ² L1: 5'-ATGGCTCATGGCTGTGATAG-3' ²	46C→T en el exón 1 del gen del <i>F12</i> . Genera un codón de iniciación alternativo (ATG)
Grupo ABO	Exón VI: mo46: 5'-CGGAATTCCTCGCCACTGCCTGGGTCTC-3' mo-57: 5'-CGGATCCATGTGGGTGGCACCCCTGCCA-3' Exón VII: mo-101: 5'-CGGGATCCCCGTCCGCCTGCCTTGACAG-3' mo-71: 5'-GGGCCTAGGCTTCAGTTACTG-3'	Exón VI y exón VII de <i>locus</i> del ABO.
ANÁLISIS	Sondas de hibridación	
Análisis FXII C46T	Oligonucleótidos : F12S ³ 5'-TCCCTTCTTCTGCTTCCAGT-3' L1: 5'-ATGGCTCATGGCTGTGATAG-3' ² Sondas: Donante F12-FL : 5'-GGACCAACGGA CGGACGCCA-3'flu ⁴ Aceptora F12-LC: 5'-LC640-AGGGCTCTGCTGCTCCTGGGGTTCCTG-3'pho ⁵	46C→T en el exón 1 del gen del <i>F12</i> . Genera un codón de iniciación alternativo ATG

- 1- Oligonucleótido de mutagénesis que cambia para introducir la diana de restricción. Crear una diana de restricción (subrayado la base cambiada).
- 2- Oligonucleótidos para la genotipación del *FXII C46T* mediante PCR y análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica.
- 3- Oligonucleótido utilizado para la genotipación mediante sondas de hibridación.
- 4- Sonda marcada con fluoresceína en 3'.
- 5- Sonda marcada con el fluorocromo LCRed 640 en el extremo 5' y en el extremo 3' terminal está fosforilada para evitar la extensión.

2.4 Electroforesis en geles de agarosa

En general se utiliza para separar los fragmentos de ADN en función de su tamaño, haciéndolos pasar a través de un campo eléctrico. El ADN se visualiza al teñir el gel de agarosa con bromuro de etidio, el cual se intercala entre las timinas y es visible cuando el gel es irradiado con rayos ultravioleta de 300nm.

Existen distintos tipos de agarosa, con variadas aplicaciones, dependiendo de lo que necesitemos para el análisis del ADN y el tamaño de los fragmentos de ADN a visualizar.

Protocolo general de la preparación de un gel de agarosa:

- Se pesa la agarosa según el porcentaje deseado (la migración de los fragmentos está en función inversa a su tamaño y a la concentración de la agarosa).
- Se añade a la agarosa TBE 1X (tampón con: Tris, ácido bórico y EDTA. Life Technologies) y el bromuro de etidio para una concentración final de 0.5 µg/ml. Se disuelve con calor.
- Se vierte la agarosa sobre un molde, colocando un “peine” que nos permite hacer los pocillos en los que más tarde se cargará el ADN. Cuando está solidificada, se coloca en una cubeta de electroforesis y se añade TBE 1X hasta que cubra el gel.
- Después de añadir el tampón de carga (ver reactivos) en una proporción 1:5 a las muestras de ADN, se cargan las muestras en los pocillos.
- Se conecta la fuente eléctrica. Hay que tener en cuenta que el ADN en el tampón de TBE tiene carga negativa por lo que migrará hacia el polo positivo. Se deja correr hasta que las bandas de ADN se han separado. Se visualiza en un transiluminador de ultravioleta. Para facilitar la identificación de las bandas de ADN, se carga en uno de los pocillos un marcador de peso molecular de ADN determinado, en función del tamaño de los fragmentos que deseamos visualizar.

Reactivos utilizados

- TBE (Tris, Bórico, EDTA) 1X:
TBE 10 X (Life Technologies), diluir a 1/10 para obtener 1X (pH a 8.3).
 - Tampón de carga: 0.25% naranja (Orange G, SIGMA); 40% Sacarosa (Merck).
 - Marcador de peso molecular del ADN: 210 µl de colorante naranja (0,25 % de Orange G y 40% sacarosa); 960 µl de TE 10/1 (Tris 10 mM; EDTA 1mM); 60 µl de marcador 1 Kb Ladder (GIBCO-BRL 520-5615SA).
-

2.5. Secuenciación automática.

La técnica utilizada está basada en la metodología descrita por Sanger *et al.*, (Sanger *et al.*, 1977) utilizando un secuenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyser.

1- Amplificación por PCR del fragmento a secuenciar en las condiciones adecuadas y posterior purificación del producto de PCR mediante las columnas de intercambio iónico del *kit* de Qiagen (QIAquick PCR purification Kit Protocol). Con esta purificación se eliminan los nucleótidos y los oligonucleótidos sobrantes de la reacción de PCR.

2- Reacción de secuenciación: A partir de un oligonucleótido complementario a la cadena de ADN a secuenciar, se van incorporando los nucleótidos (dNTP) por complementariedad. Cuando se incorpora un dideoxinucleótido, ddNTP's (Sanger *et al.*, 1977), la reacción se para. Cada uno de los ddNTP's lleva incorporado un fluorocromo, que emite fluorescencia a diferente longitud de onda y esta fluorescencia la detecta el secuenciador automático ABI PRISM 3100, reconociendo la base incorporada.

La reacción se realizó en un volumen de reacción de 10 µl que contenían 2 µl de ADN purificado, 3 µl de *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems USA, versión 2.00) siguiendo el protocolo recomendado, 5% de dimetilsulfóxido vol/vol, 1 µl del oligonucleótido a 3,2 µM y se ajustaba con H₂O.

El programa de reacción de secuencia se llevó a cabo en el termociclador 9700 (Applied Biosystems).

3'.....	94°C	
10''	96°C	}
5''	50°C	
4'	60°C	

El producto de la reacción de secuenciación se purificó mediante precipitación con etanol al 60%:

- Añadir a los 10 µl del volumen del producto obtenido, 10 µl de H₂O y etanol (Merck) (hasta llegar a una concentración final del 60%). Centrifugar 20 min. a 14.000 rpm.
- Eliminar la solución de etanol y añadir 200 µl de etanol al 70% y volver a centrifugar a 14.000 rpm. Eliminar la solución de etanol al máximo hasta obtener el precipitado purificado.

3 - Análisis de secuencia:

Después de la purificación de la reacción de secuenciación, el precipitado se resuspendía en 15 µl de formamida desionizada y se procesó en el secuenciador automático ABI PRISM 3100, siguiendo las instrucciones del programa *sequencing*, de la casa comercial (Applied Biosystems, USA). El análisis de secuencia se realizó con el secuenciador automático siguiendo las instrucciones de la casa comercial Applied Biosystems, USA.

2.6. Genotipación del polimorfismo del gen *F12* por hibridación con sondas fluorescentes.

Diseño de oligonucleótidos y sondas fluorogénicas.

El proceso de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el posterior análisis de hibridación se llevó a cabo el termociclador rápido LightCycler (Roche) con monitorización a tiempo real de la fluorescencia. Se utilizaron los oligonucleótidos: oligonucleótido directo F12S, diseñado de nuevo, y el oligonucleótido reverso L1 descrito por Kanaji *et al* (Kanaji *et al.*, 1998) para llevar a cabo la amplificación del fragmento de 384 pb del exón 1 del gen *F12*. Además se diseñaron dos sondas de hibridación: sonda donante “F12-FL” y la sonda aceptora “F12-LC” las cuales fueron sintetizadas y purificadas mediante HPLC en fase reversa (TipMolBiol) (Tabla 8). La zona del polimorfismo C46T del gen *F12* estaba incluida en la sonda donante, “F12-FL” marcada en el extremo 3’ con fluoresceína (FL), la cual tenía una secuencia complementaria a la cadena que contiene el alelo 46C. La sonda adyacente aceptora, “F12-LC” marcada con el fluoróforo LightCycler Red 640 (LCRed640) en el extremo 5’ terminal y en el extremo 3’ terminal estaba fosforilada para evitar la extensión mediante la *Taq* polimerasa.

Protocolo.

- El análisis se llevó a cabo en un termociclador LigthCycler (Roche Molecular Biochemicals, USA). El procedimiento de la amplificación por PCR:

1- Se preparó la mezcla de reacción con un volumen final de 20 μ l: mezcla de las sondas de hibridación a 0,2 μ M y los oligonucleótidos a 0,5 μ M; la FastStart Taq DNA polimerasa; tampón de reacción 10X, que incluye dNTP's y 10mM $MgCl_2$ y aparte, una solución de $MgCl_2$ 25mM. La concentración final de $MgCl_2$ se ajustaba a 2mM y se ajustaba al volumen final de la reacción con H_2O libre de nucleasas.

2- Se añadió la mezcla y posteriormente cada muestra a los capilares de vidrio (Roche Molecular Biochemicals, USA). Posteriormente se centrifugaba para que la muestra quedara bien introducida en el capilar antes de taponarlo.

3- Se cargaron los capilares en el termociclador LightCycler y se procedía al programa (ver tabla 9) que incluía una fase de activación previa de la Fast Start Taq DNA polimerasa (Roche) a 95°C durante 5-10 min. La Fast Start es una polimerasa que se encuentra en una forma recombinante termoestable, y que es inactiva a temperatura ambiente, debido a unos grupos que la bloquean sobre algunos residuos de aminoácidos del enzima. Cuando se eleva la temperatura se desplazan estos grupos que están bloqueando y se activa la enzima. Posteriormente seguía el programa de PCR específico y finalmente el programa del análisis de la curva de hibridación (Tabla 9). En este protocolo, la PCR de amplificación y la detección ocurrían en el mismo tubo cerrado.

Tabla 9. Programa de PCR para la amplificación del fragmento *F12C46T* y de la curva de hibridación para la detección de la mutación.

Fase	Nº Ciclos	Temperatura °C	Tiempo (segundos)	Razón de rampa (°C/segundos)	Adquisición
Activación	1	95	300	20	No
PCR: Desnaturalización	55	95	2	20	No
Hibridación		57	12	20	Sencillo
Extensión		72	10	20	No
Hibridación	1	95	5	20	No
		47	15	20	No
		85	0	0.2	Continuo
Enfriamiento	1	30	30	20	No

Interpretación de resultados:

Cuando las sondas están totalmente hibridadas a sus correspondientes cadenas complementarias, la sonda aceptora (F12 LC) se encuentra a una distancia de dos bases del extremo 3' de la sonda donante (F12 FL). Cuando estas sondas están muy cercanas, una de otra, se transfiere una energía de resonancia fluorescente (FRET), produciendo una emisión específica de fluorescencia del fluoróforo LC-Red 640 (TibMolBiol), como resultado de la excitación por fluoresceína. Mediante el programa del LightCycler, la fluorescencia se mide de manera continua durante toda la fase de hibridación, que incluye un incremento lento de la temperatura hasta producir la total disociación de las sondas marcadas. La señal de fluorescencia (F) está representada en tiempo real frente a la temperatura (T). Las curvas de hibridación se representan en función del cociente de la derivada negativa de la F, con respecto a la T ($-dF/dT$) respecto a la temperatura [$-(dF/dT)$ vs T]. De manera que debido a la presencia de la mutación puntual C46T, en el alelo T se produce la falta de complementariedad completa con la sonda de detección, produciendo una desestabilización del híbrido y una temperatura de hibridación (T_m : *temperatura melting*, T hibridación) menor, ya que en este diseño la sonda “F12 FL” incluye el genotipo del alelo normal (46C). Los portadores del alelo T generan un descenso de emisión de fluorescencia a una temperatura inferior a los portadores del alelo C.

Ese cambio, que produce una mutación puntual, es suficiente para diferenciar mediante las temperaturas de hibridación (T_m) la presencia de cada uno de los alelos en cada individuo estudiado. En nuestro caso obtuvimos los siguientes resultados:

<i>Genotipo</i>	<i>T_m</i>
Homocigoto para el alelo 46C	70.3°C
Homocigoto para el alelo 46T	62.5°C
Heterocigoto C/T	62.5°C y 70.3°C

3. Métodos estadísticos:

En función de cada uno de los estudios elaborados en el trabajo los métodos utilizados han sido diferentes.

3.1 Estudio de asociación: caso-control.

En primer lugar se generó una amplia base de datos donde se introducían todas las variables fenotípicas, genotípicas y clínicas del estudio para su posterior análisis. Los grupos de pacientes (caso) y de controles (control) no mostraban diferencias significativas en función de la edad y sexo y todos eran de la misma área geográfica para evitar sesgos en el estudio. El método de la T de Student se utilizó para calcular las diferencias de las medias de las distintas variables entre dos grupos independientes. La comparación de frecuencias se llevó a cabo mediante el análisis de χ^2 . Se consideraron diferencias significativas si los valores de P eran inferiores a 0.05. El método de regresión logística (Hosmer y Lemeshow 1989; Kleinbaum 1994) se utilizó para estimar la *odds ratio* (OR) cruda y ajustada del riesgo de un defecto asociado con la enfermedad tromboembólica y se calculó con un intervalo de confianza del 95%. Los ajustes se realizaron en función de covariables como el sexo, edad y defectos que podían estar presentes. Se llevó a cabo el análisis de variancia (Kleinbaum *et al.*, 1988) (*one-way ANOVA*) para comparar diferencias entre las medias de una determinada variable entre diferentes posibilidades del genotipo. Para llevar a cabo el análisis de algunas variables cuantitativas como los niveles de los factores de la coagulación se generaron variables categóricas en función del genotipo, en función de los

diferentes percentiles, o en función de cuartiles de las variables. Las diferencias en función del sexo o edad se analizaron por el método de χ^2 y por análisis de correlación respectivamente.

3.2 Estudio de asociación en familias con algún factor de riesgo trombótico conocido.

Se utilizó un modelo de regresión para calcular los riesgos (*odds ratios* OR) asociados a padecer tromboembolismo venoso. Siempre se tuvo en cuenta la edad del evento como la edad de la primera trombosis venosa. En todos los casos se ajustó el análisis mediante sexo y edad como covariables. Se consideró como estadísticamente significativo el valor de $P < 0,05$.

Cuando se analizaron la relación del uso de anticonceptivos orales o embarazo con relación a la trombosis venosa, se consideró sólo las mujeres en edad fértil. Para la estimación de las medianas de los diferentes grupos estudiados de la edad libre de trombosis (en años), se utilizó el método de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Kaplan y Meier 1958). El análisis se hacía frente al grupo de referencia que estaba compuesto por familiares que no presentaban el defecto estudiado. Las diferencias entre factores se analizaron mediante el método de *log-rank test*. Finalmente se utilizó el método de la regresión de Cox (Cox y Oakes 1984), para poder estimar el riesgo (OR) a padecer trombosis venosa respecto a individuos normales (sin el defecto). Se ajustó en todos los casos por edad, sexo y tipo de individuo estudiado (*propositus* o familiar). El ajuste según el tipo de individuo obviaba la necesidad de calcular el riesgo después de excluir a los *propositi*.

Se llevó a cabo el cálculo de las incidencias del primer evento trombótico en familiares con (portadores) y sin el mismo déficit (no portadores) entre diferentes grupos de familias. El cálculo se llevó a cabo dividiendo el número de eventos en cada grupo por el cálculo de pacientes-años de seguimiento del total de individuos en el grupo. El seguimiento de los individuos sintomáticos empezaba en el nacimiento y finalizaba a la edad de la primera trombosis venosa.

3.3 Estudio de ligamiento genético.

Los datos obtenidos después del análisis genético correspondiente, eran introducidos en una base de datos orientada al estudio en familias (Southwest Foundation for Biomedical Research, San Antonio, TX) (Dyke 1995). Seguidamente se analizó la frecuencia alélica en el *locus* de la protrombina. Para ello se utilizó el método de máxima verosimilitud, teniendo en cuenta la estructura de árbol familiar, y se utilizó el programa estadístico SOLAR (programa de la Southwest Foundation for Biomedical Research, San Antonio, TX) (Almasy y Blangero 1998).

El análisis de ligamiento basado en la descomposición de la variancia de un rasgo discreto, estado de afectación de la enfermedad, en este caso la trombosis, fue llevado a cabo mediante un modelo de umbral tal como se describe por Duggirala *et al* (Duggirala *et al.*, 1997).

Si una variante es funcional y no hay otras variantes funcionales en el gen candidato de nuestra investigación, entonces un análisis de ligamiento condicionado a las determinaciones genotípicas (como puede ser la prueba de ligamiento en el cual el genotipo determinado esta controlado) no debería tener evidencia de ligamiento. Esto es debido a que toda la variancia genética que es debida al QTL y debería modificarse cuando el QTL por si mismo es usado como covariable. Por otro lado, si la variante esta en desequilibrio de ligamiento con un lugar funcional, el análisis de ligamiento tendría poder predictivo adicional sobre las determinaciones genotípicas y tendrán una clara evidencia de ligamiento.

Los parámetros de descomposición de la variancia fueron estimados mediante el método de máxima verosimilitud y las pruebas de hipótesis fueron llevadas a cabo mediante el *test* estadístico de la razón de verosimilitud (Kendall y Stuart 1967, Self y Liang 1987). Como algunas de las familias fueron recogidas a través de un *propositus* con trombofilia, todos los análisis fueron llevados a cabo con un factor de corrección para corregir el sesgo en la estimación de los parámetros relevantes de la población general.

PUBLICACIONES

Trabajo nº 1

Patients with venous thromboembolism have a lower APC response than controls. Should this be regarded as a continuous risk factor for venous thrombosis?

Tirado I, Mateo J, Oliver A, Borrell M, Souto JC, Fontcuberta J. Haematologica. 1999 May;84(5):470-2

Link:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=10329932&query_hl=1

Trabajo nº 2

Identification of a large deletion and three novel mutations in exon 13 of the factor V gene in a Spanish family with normal factor V coagulant and anticoagulant properties. Soria JM, Blangero J, Souto JC, Martínez-Sánchez E, Martínez-Marchán E, Coll I, Tirado I, Cercós A, Almasy L, Fontcuberta J. Hum Genet, 2002; 111: 59-65.

Link:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=12136237&query_hl=1

Trabajo nº 3

Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. Soria JM, Almasy L, Souto JC, Tirado I, Borrell M, Mateo J, Slifer S, Stone W, Blangero J and Fontcuberta J. Blood, 2000; 95: 2780-2785.

Link:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=10779421&query_hl=1

Trabajo nº 4

Contribution of prothrombin 20210A allele and factor V Leiden mutation to thrombosis risk in thrombophilic families with other hemostatic deficiencies.

Tirado I, Mateo J, Soria JM, Oliver A, Borrell M, Coll I, Vallvé C, Souto JC, Martínez-Sánchez E, Fontcuberta J. Haematologica 2001; 86: 1200-1208.

Link:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=11694407&query_hl=1

Trabajo nº 5

Association after linkage analysis indicates that homozygosity for the 46C→T polymorphism in the *F12* gene is a genetic risk factor for venous thrombosis.

Tirado I, Soria JM, Mateo J, Oliver A, Souto JC, Santamaría A, Felices R, Borrell M, Fontcuberta J. Thromb Haemost 2004; 91: 899-904.

Link:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15116249&query_hl=7

Trabajo nº 6

Rapid detection of the 46C→T polymorphism in the Factor XII gene, a novel genetic risk factor for thrombosis, by melting peak analysis using fluorescence

hybridization probes. Tirado I, Fontcuberta J and Soria JM. Genetic Testing 2003; 7:295-301.

Link:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15000805&query_hl=1

Trabajo nº 7

Complexity of the genetic contribution of different thrombotic risk factors in a Spanish thrombophilic family. García A, Calabuig M, Santamaría A, Tirado I, Coll I, Soria JM, Fontcuberta J. Thromb Haemost 2005; 93: 997-8.

Link:

http://www.thrombosis-online.com/z/30_zeitschriften_ihv.asp?load=/zs/thromb/2005/93/5/ihv.asp

Trabajo nº 8

The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. Tirado I, Mateo J, Soria JM, Oliver A, Martínez-Sánchez, Vallvé C, Borrell M, Urrutia T, Fontcuberta J. Thromb Haemost 2005; 93: 468-74.

Link:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15735796&query_hl=1

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Trabajo nº 1 :

Patients with venous thromboembolism have a lower APC response than controls. Should this be regarded as a continuous risk factor for venous thrombosis? Haematologica. 1999; 84: 470-2.

En este trabajo se analizó la prevalencia de la resistencia a la proteína C activada (RPCa) en un estudio caso-control. En primer lugar analizamos el rango de normalidad para la RPCa en nuestro grupo control, definido con los percentiles 2,5 y 97,5 de los valores expresados como la razón rPCa (ver métodos, página 86) y obtuvimos los valores de rPCa: 2,08-3,95. Así los individuos con un rPCa < 2,08 mostraban el fenotipo de la RPCa. Los pacientes (casos) mostraron valores de rPCa inferiores a los controles (figura 1 del trabajo nº1), mostrando diferencias significativas: 0,15, IC 95%: 0,03-0,27 (p<0,05), incluso después de excluir los individuos con fenotipo de RPCa. Las mujeres mostraron valores de rPCa inferiores respecto a los hombres y la diferencia observada, después de excluir individuos con el fenotipo de RPCa fue de: 0,20, IC 95%: 0,09-0,30 (p<0,0001). No se observó influencia de la edad en los valores de la RPCa. Respecto al riesgo a padecer trombosis venosa, los pacientes con RPCa mostraron un incremento del riesgo de hasta 5,4 veces mas respecto al grupo control (OR 5.4; IC 95%: 1,8-16,4, ajustado por edad y sexo). Además observamos una relación inversa entre el riesgo a padecer trombosis venosa y el grado de RPCa: para un valor de rPCa <2,08, el riesgo era de un OR: 6,25 (IC 95%: 2,01-19,42); para rPCa entre 2,02-2,50 mostraban un OR: 1,82 (IC 95%: 0,92-3,59); en los casos con rPCa >2,5 se consideró el valor de referencia.

En nuestro estudio un total de 4 controles y de 29 pacientes mostraron el fenotipo de RPCa, resultando una prevalencia de 3,9% (IC 95%:1,1-9,6) en el grupo control y 15,6% (IC95%: 10,4-20,8) en el grupo de los pacientes. Cuando se excluyeron del análisis los individuos que presentaban anticoagulante tipo lúpico, la prevalencia en el grupo de los pacientes disminuía a un 12,8% (IC 95%: 7,9-17,7). Además fueron identificados otros defectos protrombóticos en 17 pacientes: 2 presentaban deficiencia de antitrombina, 2 deficiencia de PC y 13 mostraban deficiencia en PS. Un paciente de los que tenía la deficiencia de PS asociaba RPCa y era portador de la mutación Factor V Leiden (FVL). En el grupo control se identificó 2 individuos portadores heterocigotos para la mutación FVL mostrando así una prevalencia de 1,9% (IC 95%: 2,4-6,8). Además de los 22 pacientes con

RPCa y en ausencia del anticoagulante tipo lúpico, 17 eran portadores heterocigotos de la mutación FVL (77,3%: IC95%: 54,6-92,2).

Aunque la enfermedad tromboembólica es una enfermedad frecuente, las deficiencias hereditarias conocidas hasta el momento son poco frecuentes o tienen una prevalencia baja en la población (Mateo *et al.*, 1997). La RPCa es probablemente una de los factores de riesgo más frecuente en pacientes con trombofilia hasta el momento, (Dahlback *et al.*,1993) a pesar de que la RPCa es menos prevalente en España que en otras regiones de Europa (Koster *et al.*, 1993). En nuestro estudio observamos como los pacientes mostraban valores de rPCa inferiores que en los individuos del grupo control incluso, después de excluir los individuos con el fenotipo de la RPCa. Se ha descrito que uno de los motivos de este tipo de observaciones puede ser debido a una respuesta de fase aguda de la enfermedad (Svensson and Dahlbäck 1994), sin embargo en nuestro estudio no es el caso, ya que los pacientes que se encontraban en fase aguda de la enfermedad tromboembólica fueron excluidos del estudio. Otra posibilidad es la existencia de otros factores genéticos o adquiridos que puedan contribuir al fenotipo de la RPCa (Soria *et al.*, 2003). De acuerdo con otros autores (Koster *et al.*, 1993) hemos observado una relación inversa entre el riesgo a padecer trombosis venosa y los valores de rPCa, sugiriendo que la RPCa debería ser considerada como una variable continua que incrementa el riesgo a padecer trombosis. Se requieren nuevos estudios para poder determinar si una respuesta disminuida a la PCa esta asociada a un incremento del riesgo de padecer tromboembolismo venoso, independientemente de la presencia o no de la mutación Factor V Leiden.

Trabajo nº 2:

Identification of a large deletion and three novel mutations in exon 13 of the factor V gene in a Spanish family with normal factor V coagulant and anticoagulant properties. Hum Genet, 2002; 111: 59-65.

Este trabajo aborda el papel de los polimorfismos en el gen *F5* como determinante genético de la variación fenotípica normal de los niveles de factor V en plasma y de otros parámetros relacionados con la hemostasia.

Durante el análisis de los polimorfismos del exón 13 del gen *F5*, detectamos una deleción de 108 pares de bases (deleción que cubre desde el nucleótido 3997 al 4104, 3997-4104EX13del) en ocho de los veinte individuos de una familia perteneciente al

proyecto GAIT (figuras 1-4 del correspondiente trabajo). En cambio ninguno de los 378 individuos restantes reclutados para el proyecto GAIT eran portadores de la mutación. Tampoco se identificó en 200 controles sanos no emparentados, indicando que es una mutación muy poco frecuente.

Esta delección afectaba exactamente a 36 aminoácidos pertenecientes al dominio B de la molécula del FV; de esta manera no se alteraba la pauta de lectura de la secuencia ya que empezaba en la primera base que codifica para el codón Leu1276 y finalizaba en la tercera base del codón Asn1310. La proteína mutada resultante, si se expresaba, debería contener 36 aminoácidos menos en el dominio B del FV que la proteína codificada por el alelo no mutado. Entre los aminoácidos delecionados se encuentra el polimorfismo A4070G, que produce un cambio de histidina (H) a arginina (R) en la posición 1299 (H1299R). Se ha descrito que este polimorfismo podría afectar a los niveles o a la función del FV (Lunghi *et al.*, 1996; Bernardi *et al.*, 1997). Además, en la misma familia identificamos tres variantes alélicas nuevas en el exón 13 del gen del *F5*: L1257I que producía un cambio de leucina (L) a isoleucina (I), Q1317Q que no cambiaba el aminoácido glutamina (Q) y T1327T que tampoco cambiaba el aminoácido treonina.

Ningún miembro de la familia era portador de la mutación FVL, tal como se esperaba ya que los valores de la RPCa eran normales. Para investigar las posibles implicaciones de esta delección comparamos los valores de una serie de fenotipos relacionados con la hemostasia (tabla 1 del trabajo) entre los individuos de la familia que eran portadores de la delección y los que no, mediante el método de descomposición de la varianza. Ninguno de los fenotipos estudiados mostró diferencias significativas, todos los valores estaban dentro del rango de normalidad utilizado en nuestro laboratorio. Estos resultados sugerían que este defecto genético no mostraba efecto fenotípico. Es importante destacar que ningún miembro de esta familia, incluidos los portadores de la delección había sufrido episodios trombóticos ni hemorrágicos.

El FV es una proteína que juega un papel importante como procoagulante y como anticoagulante. En un estudio en el que se analizó el papel del dominio B de la molécula del FV mediante ensayos *in vitro*, se observó que la pérdida de una zona bastante grande entre los aminoácidos 811 y 1441 del dominio B producía una molécula de FV que sólo presentaba un $38 \pm 7\%$ de su actividad normal (Kane *et al.*, 1990). Por consiguiente pensamos que la mutación encontrada en el dominio B del FV podría llegar a producir una

perdida de las funciones procoagulantes o anticoagulantes de la proteína del FV. Sin embargo, en los análisis de los fenotipos implicados en la hemostasia realizados en la familia del estudio y al comparar entre los individuos portadores de esta delección y aquellos individuos no portadores, no detectamos ninguna diferencia. Ni entre las características coagulantes y anticoagulantes del FV, ni tampoco en los niveles plasmáticos de la proteína del factor V.

Así pues los resultados de este trabajo demostraron que el alelo mutado, portador de la delección de 36 aminoácidos en el dominio B de la proteína del FV, se expresaba y la proteína resultante era funcional. Además, nuestros resultados demostraron que el polimorfismo A4070G del gen *F5*, que se encontraba dentro de la delección, y las nuevas variantes de ADN descritas en este trabajo no alteraban las propiedades funcionales de la proteína del factor V. Estos resultados contradecían los resultados obtenidos por *Bernardi et al* (Bernardi *et al.*, 1997) que asociaban el polimorfismo A4070G con el fenotipo de la RPCa y con los obtenidos por *Lunghi et al* (Lunghi *et al* 1996) que encontraban asociación con una reducción moderada de los niveles de factor V. Además, también se había descrito que el alelo 4070G mostraba un incremento del riesgo de trombosis venosa (Alhenc- Gelas *et al.*, 1999). Sin embargo, en estudios realizados posteriormente no se confirmó esta asociación (de Visser *et al.*, 2000) que nosotros tampoco encontramos.

Este tipo de análisis sobre el efecto funcional de las diferentes mutaciones o polimorfismos descritos en el gen *F5* amplían la información para poder llegar a entender el papel que desempeña el dominio B de la molécula del factor V de la coagulación sanguínea.

Trabajo nº 3:

Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. Blood, 2000; 95: 2780-2785.

Mediante un análisis de ligamiento genético en el estudio de familias del proyecto GAIT (ver métodos, página 79), se analizó la relación entre la variante genética PT20210A en el gen de la protrombina (*PT*) y su influencia en la actividad de la protrombina en plasma y en el riesgo de trombosis.

Se analizó la presencia de la mutación PT20210A y los niveles de la actividad de la protrombina en plasma en los 435 individuos del estudio: 397 individuos pertenecientes a las 21 familias del proyecto GAIT y 38 individuos que pertenecían a una familia adicional con idénticos criterios de selección, la cual fue reclutada y utilizada expresamente para este estudio.

Los resultados mostraron que 388 individuos eran homocigotos normales (G/G), 43 eran portadores heterocigotos (G/A) y 4 homocigotos (A/A). Mediante el análisis realizado por el método de máxima verosimilitud obtuvimos una frecuencia alélica del 0.034 en estas familias, lo cual predice una frecuencia de portadores heterocigotos para la mutación de 0,059. Este resultado replica las estimaciones previas realizadas por nuestro grupo en la población española (Souto *et al.*,1998).

Los análisis de asociación, mostraron diferencias significativas entre los 3 genotipos respecto a los niveles plasmáticos de protrombina: GG= 123,6 ± 1,8; GA= 141,1 ± 3,7; y AA=167,7 ± 8,4; $p < 1 \times 10^{-7}$ (figura 1 del trabajo nº 3). Los resultados obtenidos mediante el análisis de ligamiento por el método de la descomposición de la varianza, mostraron una señal de ligamiento genético significativo (lod score de 3,6 $p=2,4 \times 10^{-5}$) entre esta mutación y la actividad de la protrombina en plasma. Estos resultados apoyaban la hipótesis de la existencia de un QTL principal en la región del gen *PT*. Cuando realizamos un análisis de ligamiento condicional, en el que se tiene en cuenta el ajuste por la mutación PT20210A, la señal de ligamiento se perdía totalmente (lod=0,0), y no había evidencia de la existencia de un polimorfismo adicional funcional en el gen *PT*.

Se ha descrito que los niveles elevados de protrombina podrían representar un riesgo para la trombosis venosa (Poort *et al.* 1996) y por ello analizamos el efecto de este QTL sobre el riesgo de trombosis. Se llevó a cabo un análisis bivariante introduciendo simultáneamente los dos fenotipos, niveles de protrombina y el riesgo de trombosis. Este análisis bivariante dio como resultado un incremento significativo de la señal de ligamiento de la actividad de la protrombina (lod score= 4,7; $p=1,5 \times 10^{-6}$) y se obtuvo una clara evidencia del efecto de este QTL sobre el riesgo de la trombosis (lod score= 2,43; $p=0.0004$). De esta manera demostramos que existe un QTL en el gen *PT* que influye en los niveles de la actividad de la protrombina en plasma y en el riesgo de padecer trombosis venosa. Sin embargo hasta el momento se desconocen los mecanismos por los cuales la

mutación de la protrombina causa el incremento en los niveles de protrombina y por los que confiere un incremento del riesgo de trombosis. Podría ser que esta mutación estuviera implicada en algún mecanismo regulador relacionado con la estabilidad del RNA mensajero (Poort *et al.*, 1996), o bien favoreciendo la formación de la cadena de poliadenilación incrementando el RNA mensajero y la expresión de proteína (Ceelie *et al.*, 2004) debido a que la variante PT20210A se encuentra en la zona de rotura de la cadena de poliadenilación.

En resumen, estos resultados representan la primera evidencia genética que un QTL en el gen de la protombina influye en los niveles de la actividad de la protrombina y en la susceptibilidad a la trombosis y la variante alélica PT20210A representa un polimorfismo funcional.

Trabajo nº 4:

Contribution of prothrombin 20210A allele and factor V Leiden mutation to thrombosis risk in thrombophilic families with other hemostatic deficiencies. Haematologica 2001; 86: 1200-1208.

El primer objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de la mutación FVL, y la mutación PT20210A en familias con trombofilia que ya asociaban otro factor de riesgo genético (AT, PC, PS o FVL). En segundo lugar comparamos el riesgo de desarrollar trombosis venosa en los diferentes defectos trombofílicos estudiados: AT, PC, PS, mutación FVL o mutación PT20210A, así como el efecto que produce la interacción gen-gen, en el caso de la asociación de 2 o más defectos, sobre el riesgo a padecer trombosis.

Para la consecución de estos objetivos se estudiaron 722 familiares pertenecientes a 132 familias españolas con trombofilia asociada a alguno de estos defectos (ver métodos, punto 1.2 página 74).

Estudio familiar. La prevalencia de la mutación FVL en las familias portadoras de otros defectos fue: en 2 familias con deficiencia de AT (18,2%), en 5 con la deficiencia de PC (14,7%) y 4 que asociaban deficiencia de PS (10,0%; 3 deficiencia tipo III y 1 deficiencia del tipo I). Además la mutación FVL estaba presente en miembros de las familias en las cuales el propositus no presentaba dicha mutación. En todos los casos los individuos que eran portadores de la mutación FVL eran heterocigotos. Por otro lado la mutación

PT20210A se detectó en: 1 familia con deficiencia de AT (9,1%), en 7 con deficiencia de PC (20,6%) en 5 con deficiencia de PS (12,5%) y en 6 con la mutación FVL (18,8%). También se observaron 19 familiares portadores de la mutación de la protrombina en familias donde el propositus no la tenía, 2 de los cuales eran homocigotos para la mutación.

La prevalencia de propositus portadores de la mutación FVL en familias con algún otro defecto era superior respecto a la prevalencia de dicha mutación en la población general (6/201, 2,9% IC 95%: 1,1-6,4). Concretamente en el caso de las familias con deficiencia de PC se observó una tendencia a mostrar una diferencia significativa (11,7; IC 95%: -0,4-23,9). De manera similar la prevalencia de la mutación PT20210A era superior en familias con otro defecto respecto a la prevalencia en la población general (13/201, 6,5%, IC 95%: 3,5-10,8). En los casos de la deficiencia de PC que asociaban la mutación PT20210A observamos una tendencia a mostrar una diferencia significativa (14,1, IC 95%: 0,1-28,1).

Parámetros Clínicos. (ver tabla 2 del correspondiente trabajo). Uno de los resultados clínicos más interesantes era que las mujeres con la mutación FVL o la PT20210A mostraron una tendencia a incrementar el riesgo de trombosis asociada al uso de anticonceptivos orales (OCRT *oral contraceptive-related thrombosis*). Así 6 de 11 mujeres con la mutación FVL y 3 de 3 con ambas mutaciones presentaban una OCRT. Cuando las mujeres con un sólo defecto y las mujeres en las cuales se asociaba la mutación de la PT20210A se consideraban de manera separada, la OCRT era más frecuente en el grupo que asociaba un defecto a la PT20210A (diferencia 30,9%, IC 95% 1,2-60,5). La prevalencia de trombosis recurrentes no presentó diferencias significativas, sin embargo se apreció una tendencia a presentar mayor proporción de trombosis múltiple en pacientes con deficiencia de PC que asociaban FVL o PT20210A comparado con aquellos pacientes con deficiencia aislada de PC. Resultados similares se observaban en el grupo con la mutación FVL respecto al grupo que asociaba FVL y PT20210A. La frecuencia más baja del tromboembolismo recurrente (35%) era en los casos de portadores de la mutación PT20210A de forma aislada.

En nuestro estudio observamos que en aquellos pacientes con un defecto aislado, la media de edad de la 1ª trombosis era entre 30 a 40 años mientras que los pacientes con

deficiencias en AT o PS, que además asociaban la mutación FVL o la PT20210A, la 1ª trombosis aparecía a una edad más temprana.

La localización de la trombosis no mostraba diferencias significativas entre los diferentes defectos, sin embargo la presencia de trombosis superficial era más frecuente en pacientes con la mutación FVL o con la deficiencia de PS. Además los pacientes con FVL mostraban una menor tendencia a padecer tromboembolismo pulmonar.

Riesgo de trombosis y asociación con las mutaciones FVL o PT20210A. (tabla 1 del trabajo) El riesgo de padecer trombosis venosa era superior en pacientes que asociaban dos defectos que en los que presentaban un defecto aislado. Las correspondientes OR ajustadas por sexo, edad y tipo de individuo (propositus o familiar) se muestran en la tabla 1 del trabajo. En nuestro estudio observamos que el riesgo de padecer trombosis era inferior en los individuos portadores de la mutación PT20210A que en el resto de los defectos (4,2 ; IC95%: 1,8-9,8). En todos los casos que se asoció la mutación FVL a otra deficiencia se observó un incremento del riesgo. En el caso de la mutación PT20210A si se asociaba a otro defecto incrementaba el riesgo a padecer trombosis venosa, excepto, en el caso de la deficiencia de PC.

Se analizaron las curvas de supervivencia libres de trombosis para cada uno de los defectos con o sin las mutaciones PT20210A y FVL. La probabilidad de que un individuo con deficiencia de AT estuviera libre de trombosis era del 50% a los 34 años de edad (95% IC: 25-43 a.) mientras que se presentaba a los 19 o a los 21 años si asociaban la mutación FVL o PT20210A respectivamente (figura 1 del trabajo). En los pacientes con deficiencia de PC a los 62 años, el 50% (IC 95%: 43-81) había presentado al menos una manifestación de trombosis venosa. Cuando la mutación FVL o la PT20210A se asoció a estos pacientes, las edades disminuían a 33 (IC 95%: 21-45) y a 44 años (IC 95%: 16-72), respectivamente (figura 2 del trabajo). En el caso de la deficiencia de PS, el 50% de los individuos con esta deficiencia había padecido una trombosis a los 37 años de edad (IC 95%: 31-43) o a los 24 (IC 95%: 14-50) o a los 36 años (IC 95%: 23-49) cuando la deficiencia se asociaba con la mutación FVL o a la PT20210A, respectivamente (figura 3 del trabajo). Los pacientes con la mutación FVL tenían un 50% de probabilidad de estar libres de trombosis a los 50 (IC 95%: 47-53) o a los 52 años (IC 95%: 34-70) cuando se asociaba a la mutación PT20210A (figura 4). En el caso de la mutación PT20210A (figura 5 del trabajo) los individuos mostraron el 50% de probabilidad de estar libre de trombosis a la edad de 65 años (IC

95%: 57-73). La comparación entre las curvas de supervivencia libre de trombosis de cada uno de los defectos no mostró diferencias significativas, probablemente debido al número de casos del estudio. Sin embargo, en la deficiencia de PC los individuos con la mutación FVL mostraron una tendencia a presentar ser una diferencia significativa ($p=0,0882$).

El estudio biológico de los diferentes factores de riesgo del tromboembolismo venoso es clínicamente relevante no sólo en el caso de los pacientes sino también en el caso de sus familiares asintomáticos que presenten el mismo factor de riesgo.

En este estudio se comparó el riesgo de padecer trombosis en los individuos con diferentes defectos asociados a la trombofilia hereditaria en población española. Los resultados obtenidos mostraron que la probabilidad de desarrollar trombosis era similar en los casos de deficiencia de AT, PC o PS a los reportados por otros grupos en otras poblaciones (Martinelli *et al.*, 1998; Pabinger and Schneider 1996). Sin embargo en los casos con la mutación FVL nuestros resultados diferían de los descritos por Martinelli *et al* (Martinelli *et al.*,1996), probablemente debido a que en nuestro estudio no considerábamos la trombosis arterial. Además este es el primer estudio familiar que describe el riesgo de trombosis venosa en individuos con trombofilia hereditaria debida a la mutación PT20210A en el gen de la protrombina y que compara este con el riesgo asociado con otros defectos genéticos.

Coincidiendo con otros estudios, se ha descrito una proporción menor de tromboembolismo pulmonar en pacientes con la mutación FVL (Hille *et al.*, 1997), aunque el mecanismo asociado a esta baja incidencia de embolismo pulmonar en portadores de FVL se desconoce hasta el momento. Además nuestros resultados confirman la relación del uso de anticonceptivos orales y la trombosis venosa en portadores de FVL o PT20210A (Helmerhorst *et al.*, 1997).

El aumento de la prevalencia de las mutaciones FVL o PT20210A en familias con otros defectos respecto a la prevalencia en la población general puede ser debido a que los individuos que asocian más de un factor de riesgo de trombosis tienen más probabilidades de sufrir episodios trombóticos y por ello acaban estudiándose, por la presencia de su clínica trombótica. En nuestro estudio la asociación de la mutación FVL a otros defectos representa un incremento de riesgo, por el contrario en el caso de la mutación PT20210A no sucede en todos los casos, lo que sugiere que esta variante alélica puede representar un

factor de riesgo más débil. De hecho, algunos homocigotos para esta mutación son asintomáticos a una edad relativamente avanzada (Souto *et al.*, 1999).

En conclusión, basándonos en los resultados obtenidos y en la alta frecuencia que se presenta el FVL y la PT20210A en individuos de nuestro entorno, debería considerarse la necesidad de una criba sistemática de estas dos mutaciones en pacientes que tengan otros defectos trombofílicos, así como en las pacientes con trombofilia que deseen iniciar el uso de anticonceptivos orales.

Trabajo nº 5

Association after linkage analysis indicates that homozygosity for the 46C→T polymorphism in the F12 gene is a genetic risk factor for venous thrombosis. Thromb Haemost 2004; 91: 899-904.

A partir del análisis global del genoma realizado en el proyecto GAIT, nuestro grupo demostró que el polimorfismo C46T en el *locus* del gen *F12* influía sobre la variabilidad de los niveles plasmáticos del factor XII (FXII) y sobre la susceptibilidad a la enfermedad tromboembólica (Soria *et al.*, 2003).

El siguiente paso fue determinar la prevalencia de este polimorfismo en nuestro medio y determinar el riesgo que representa para los pacientes con trombofilia portadores de esta variante alélica. Para ello analizamos los niveles plasmáticos de FXII y genotipamos el polimorfismo C46T, en nuestro estudio de asociación caso-control (ver métodos página 71).

Prevalencia del polimorfismo C46T en el gen *F12*. La prevalencia de los homocigotos para el polimorfismo C46T (T/T) fue del 2,0% (IC 95%: 0,7-4,6) en el grupo control y de 6,0% (IC 95%: 3,4-9,7) en el grupo de pacientes, con una diferencia significativa ($p=0.022$). Mientras que la prevalencia de los portadores heterocigotos (C/T) no mostró diferencias significativas ($p>0,05$) entre ambos grupos (tabla 2 del trabajo).

Asociación entre el polimorfismo C46T y los niveles de FXII. Aunque los niveles plasmáticos del FXII no mostraron diferencias entre el grupo de pacientes y de controles, cuando se analizó en función del polimorfismo C46T se observaron diferencias significativas entre los 3 genotipos. Los individuos con el genotipo T/T mostraron los valores más bajos de los niveles de FXII (figura 1 del trabajo) seguido de los portadores heterocigotos para la mutación C46T y de los homocigotos normales (media \pm SD; CC=

127% \pm 23,2, CT=94% \pm 18,1; TT=62% \pm 25,0; $p < 0,0001$). Los niveles de FXII plasmáticos eran independientes de la edad y el sexo.

Riesgo de trombosis venosa. El resultado más destacable de este estudio fue que el alelo 46T en homocigosis (T/T) se asoció a un incremento de riesgo de trombosis, OR: 4,82 (IC 95%: 1,5-15,6), ajustado por edad, sexo y otros factores de riesgo conocidos para la trombosis venosa (AT, PC, PS, mutaciones de FVL y PT210210A, niveles elevados de FVIII y presencia de anticuerpos antifosfolípidos) sugiriendo que este polimorfismo es un factor de riesgo independiente para el tromboembolismo venoso. Aunque el riesgo de la trombosis venosa asociada a los niveles de FXII no alcanzó el nivel de significación estadística, los niveles bajos de FXII (niveles correspondientes al percentil del 5%, $< 71\%$ en el grupo control) eran más frecuentes en el grupo de pacientes (19 de 244, 7,8%) que en el grupo de controles (13 de 244; 5,3%). Cuando excluíamos del análisis los individuos homocigotos para el polimorfismo C46T (T/T) esa tendencia desaparecía.

La prevalencia de los homocigotos T/T del 2% en el grupo control era similar a la obtenida con otras muestras de la población española (Soria *et al.*, 2002) pero diferente a otras poblaciones europeas (Endler *et al.*, 2001). Similar a otras variantes genéticas tales como las mutaciones FVL y PT20210A, las cuales muestran diferentes frecuencias alélicas en diferentes poblaciones (Rees *et al.*, 1995; Rosendaal *et al.*, 1998).

Recientemente, un estudio *in vitro* demostró como el FXII se producía en menor cantidad a partir del ADNc que contenía el alelo 46T respecto al alelo 46C (Kanaji *et al.*, 1998) atribuyendo un efecto funcional a este polimorfismo. En este contexto nuestro trabajo confirma que en función del genotipo para el polimorfismo C46T de los individuos estudiados muestran diferencias significativas en los niveles de FXII (Soria *et al.*, 2002; Endler *et al.*, 2001).

Se han publicado recomendaciones sobre las características que deberían tener los estudios de asociación para demostrar causalidad de las variantes genéticas (Editorial Nature Genetics 1999; Cooper *et al.*, 2002). Nuestro estudio de asociación realizado entre el polimorfismo C46T y la enfermedad tromboembólica satisface las recomendaciones dadas por estas publicaciones: la heredabilidad del fenotipo ha sido establecida (Souto *et al.*, 2000b); existe una fuerte evidencia de ligamiento entre esta variante genética, el fenotipo (niveles FXII) y la enfermedad (Soria *et al.*, 2002); el estudio inicial fue un estudio familiar (Soria *et al.*, 2002); y existen evidencias que este polimorfismo afecta a la

expresión del gen (Kanaji *et al.*,1998). Además seleccionamos los individuos teniendo en cuenta el origen de la zona geográfica para evitar estratificación genética entre pacientes y controles (Gambaro *et al.*, 2000; Almasy and McCluer 2002).

En conclusión nuestro estudio confirma que el polimorfismo C46T es un factor de riesgo genético de sufrir trombosis en la población española. Además, se confirma como el análisis de ligamiento, mediante un análisis global del genoma, acompañado de un estudio de asociación caso-control representan unas herramientas muy eficaces para identificar variantes genéticas que afecten a enfermedades complejas como la trombosis.

Trabajo nº 6:

Rapid detection of the 46C→T polymorphism in the Factor XII gene, a novel genetic risk factor for thrombosis, by melting peak analysis using fluorescence hybridization probes. Genetic Testing 2003; 7:295-301.

En el trabajo anterior demostramos como el polimorfismo C46T en el exón 1 del gen del FXII (*F12*) es un factor de riesgo independiente para la enfermedad tromboembólica en nuestra población. El objetivo principal de este estudio fue desarrollar un método fácil, rápido y reproducible para genotipar el polimorfismo C46T y por otro lado poder comparar su fiabilidad con la metodología clásica de análisis genético disponible para realizar el diagnóstico de este polimorfismo.

En primer lugar diseñamos un protocolo para analizar el polimorfismo C46T en el termociclador a tiempo real: LightCycler PCR (Roche). Este protocolo incluía una primera fase rápida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguido de una fase de hibridación con sondas fluorescentes específicas de alelo, para poder detectar el polimorfismo (ver métodos página 106). El análisis se realizó con el ADN de 100 individuos que previamente habían sido genotipados por el método convencional de análisis de restricción con la endonucleasa *SfnaI* (figura 1 del trabajo). Finalmente para evaluar la fiabilidad de los resultados se compararon con los obtenidos por secuenciación directa de 10 muestras con diferente genotipo (figura 2 del trabajo).

Brevemente el proceso incluía (tabla 1 del trabajo) la hibridación de las sondas, marcadas con un fluoroforo, que era monitorizado por el análisis de curvas de hibridación para genotipar el polimorfismo C46T. Se utilizaron los cebadores: el directo F12S diseñado de nuevo y el reverso L1 descrito por Kanaji *et al* (Kanaji *et al.*,1998) para llevar

a cabo la amplificación del fragmento de 384 bp del exón 1 del gen *F12*. Se diseñaron dos sondas de hibridación: la sonda donador “F12-FL” (marcada con fluoresceína) y la sonda aceptor “F12-LC” (marcada con el fluoroforo LC-Red 640) (tabla 8 página 103 de métodos). La zona del polimorfismo C46T estaba incluida en la sonda donante, *F12-FL*, la cual tenía una secuencia complementaria a la cadena que contiene el alelo 46C. Los portadores del alelo T generaban un descenso de emisión de fluorescencia a una temperatura de hibridación inferior a los portadores del alelo C. Ese cambio, que produce un cambio puntual, es suficiente para diferenciar mediante las temperaturas de hibridación la presencia de cada uno de los alelos en cada individuo estudiado. En nuestro estudio obtuvimos los siguientes resultados de *T_m*: 70,3°C para el alelo normal 46C, 62,6°C para el alelo 46T y en el caso de portadores heterocigotos (C/T) se observaban las dos temperaturas (figura 3 del trabajo).

De esta manera el método resultaba fácil y específico para el diagnóstico del genotipo, incluso con diferentes muestras que mostraban diferencias en la eficiencia de amplificación usando la metodología clásica de PCR. Es de destacar que la concordancia entre el método convencional y este nuevo método resultó del 100%: 58 individuos eran homocigotos para el alelo C, 38 era heterocigotos y 4 homocigotos para el alelo T. Igualmente los resultados de las muestras secuenciadas coincidieron también con los obtenidos por los métodos anteriores (figura 2 del trabajo).

Una de las ventajas de este método es que permite genotipar 32 muestras en menos de 40 minutos. Mientras que el análisis con enzimas de restricción requiere 2 horas para el proceso de amplificación, seguido de 16 horas para el proceso de digestión y de 2 horas para llevar a cabo la electroforesis del producto de digestión. Así mismo, el proceso de digestión, comparado con el método de PCR a tiempo real, necesita varias etapas con un procedimiento más manual que podría incrementar la posibilidad de error.

Los beneficios potenciales que puede llegar a tener un sistema de detección homogéneo han sido descritos en la bibliografía y actualmente se han diseñado métodos basados en la detección por fluorescencia para genotipar polimorfismos que producen el cambio de una base nucleotídica (Kyger *et al.*, 1998). Cuando este protocolo, que nos permite genotipar las muestras en unos 40 minutos, lo combinamos con un método de extracción rápida de ADN, los resultados se pueden obtener en 60 minutos a partir de la llegada de la muestra. Una de las ventajas de esta metodología es que todo el proceso

transcurre en un sistema cerrado, sin intervención manual después del proceso de amplificación ni durante el sistema de detección, lo cual disminuye la probabilidad de contaminación de muestra y errores de manipulación de la misma.

Así se puede concluir que esta nueva técnica es rápida, fiable y minimiza el posible error técnico. Este método de detección del polimorfismo C46T del gen *F12* debería incluirse en el estudio de pacientes con trombofilia.

Trabajo nº7:

Complexity of the genetic contribution of different thrombotic risk factors in a Spanish thrombophilic family. Thromb Haemost. Sometido.

Hasta el momento se han descritos varios factores genéticos que influyen en la patogénesis del tromboembolismo venoso y a menudo la aparición de la enfermedad es debida a la coexistencia en el mismo individuo de dos o más de estos defectos (Rosendaal 1999; Zoller *et al.*, 1999). Los individuos que presentan la combinación de varios de estos defectos muestran un mayor riesgo de padecer trombosis que aquellos que presentan un sólo defecto (Makris *et al.*, 1997, Ehrenforth *et al.*, 1998, trabajo nº 4 de esta tesis). Recientemente, hemos demostrado por análisis de ligamiento y por estudio de asociación, que el polimorfismo C46T del gen *F12* es un nuevo factor de riesgo genético para la enfermedad tromboembólica (Soria *et al.*, 2002; trabajo nº 5 de esta tesis).

El objetivo de este trabajo fue describir un caso clínico de una paciente con trombofilia hereditaria que era portadora heterocigota para la mutación Factor V Leiden (FVL) y para la mutación PT20210A del gen de la protrombina y homocigota para el alelo T del polimorfismo C46T del gen del *F12*. Esta paciente representaba el primer caso publicado donde concurrían estos tres defectos.

Caso clínico. Paciente de 41 años de edad que presentó una trombosis venosa profunda proximal y distal espontánea diagnosticada por ultrasonografía. La paciente no presentaba historia previa de tromboembolismo venoso ni arterial, pero tenía historia familiar de trombosis. Su padre había sufrido un episodio de trombosis venoso espontáneo a los 45 años de edad. Ninguno de los dos, el padre y la propositus presentaba hepatopatía o nefropatía. La paciente recibió inicialmente heparina de bajo peso molecular (Bemiparina (Hibor®) 10000 UNI cada día) durante 10 días y después un tratamiento de anticoagulación oral durante seis meses. Al finalizar el tratamiento, se llevó a cabo un estudio completo de

trombofilia para investigar la presencia de factores hereditarios o adquiridos. Como resultado del estudio observamos que la paciente era doble heterocigota para las mutaciones FVL y PT20210A y homocigota para el polimorfismo C46T del gen del *F12* (individuo II:3, figura 1 del trabajo). El estudio familiar mostró que su padre (I:2) y una de sus hijas (III:2) eran también portadores de los 3 factores genéticos en el mismo estado que la propositus (II:3). Además, todos sus hermanos y hermanas y otra hija eran portadoras del polimorfismo C46T (figura 1 del trabajo). Respecto a las mutaciones FVL y PT20210A dos familiares (II:5 y II:6) eran portadores heterocigotos para FVL y uno (II-4) heterocigoto para la PT20210A. En estudios anteriores (trabajo nº 3 de esta tesis) se había descrito que los individuos portadores de la PT20210A mostraban niveles más elevados de FII que los no portadores, pero en nuestro estudio sólo lo observamos en 2 de los 4 individuos heterocigotos para PT20210A, los dos individuos con trombosis, la propositus (139%) y su padre (137%). Además en esta familia los 5 individuos portadores heterocigotos para la mutación FVL mostraban valores normales de RPCa ($rPCA > 2,1$). Sólo la propositus y el padre mostraban valores en el límite ($rPCA$: 2,10 y 2,17, respectivamente) del rango de normalidad de nuestro laboratorio (trabajo nº 1 de esta tesis; $rPCA$: 2,1-3,9).

Este es el primer caso descrito de una familia con trombofilia asociada a estos defectos combinados, incluyendo homocigosis para el alelo mutado (T/T) del polimorfismo C46T del gen *F12*, la mutación FVL y la mutación PT20210A. Recientemente hemos publicado como el polimorfismo C46T es un nuevo factor de riesgo (trabajo nº 5 de esta tesis) para la trombosis venosa pero se desconoce como interactúa cuando cosegrega con otros factores de riesgo para la trombosis.

La enfermedad tromboembólica es una enfermedad multifactorial y compleja (Rosendaal 1999; Zoller *et al.*, 1999) y la combinación de varios defectos genéticos puede incrementar sustancialmente el riesgo de trombosis. La familia descrita en este trabajo es un buen ejemplo, ya que coexisten 3 factores de riesgo genético en el desarrollo de la clínica trombotica venosa. Además observamos que varios miembros de la familia eran asintomáticos, aunque eran portadores de uno o dos factores de riesgo trombotico. En algún caso el motivo podía ser la juventud de algunos familiares como era el caso de una de las hijas del propositus (III-2 figura 1 del trabajo).

El fenotipo RPCa en esta familia muestran valores normales a pesar de que 5 miembros eran portadores de la mutación FVL. De acuerdo con el primer trabajo de esta

tesis la RPCa es un factor de riesgo de trombosis independiente del FVL (trabajo nº 1 de esta tesis) ya que tal como demostramos, los pacientes con trombosis venosa mostraban valores de rPCa inferiores respecto a los individuos del grupo control incluso después de excluir los individuos con el fenotipo de la RPCa. Es importante destacar que los dos individuos que presentan clínica trombotica son los que muestran valores de rPCA inferiores (rPCA 2,10 y 2,17, figura 1 del trabajo). Además en un estudio realizado por nuestro grupo como parte de los resultados del proyecto GAIT, se describió como la mutación FVL era responsable solamente del 6% de la variación de los niveles de RPCa en la población general y que existían otras zonas como el nuevo *locus* en el cromosoma 18 que influía a la vez sobre el fenotipo de la RPCa, los niveles elevados de FVIII y el riesgo a la trombosis (Soria *et al.*, 2003).

Por consiguiente este estudio ilustra acerca de la complejidad de la contribución genética de los diferentes factores de riesgo trombotico en una familia española con trombofilia y permite reflexionar sobre como actuar frente a los familiares afectados y asintomáticos no tratados. En el futuro se requiere estudios prospectivos para poder optimizar la actitud a seguir en individuos no afectados de trombosis venosa que son portadores de algún factor de riesgo genético.

Trabajo nº 8:

The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. Thromb Haemost. Sometido.

El sistema sanguíneo ABO ha sido relacionado en varios estudios de asociación con niveles plasmáticos de FVIII (Orstavik *et al.*, 1985, Kamphuisen *et al.*, 1998) y vWF (Orstavik *et al.*, 1985) y en varios trabajos se ha analizado la relación entre los grupos no-O, niveles de FVIII y vWF con el tromboembolismo venoso (O'Donnell *et al.*, 1997, Wautrecht *et al.*, 1998, Koster *et al.*, 1995). Recientemente, como resultado del proyecto GAIT nosotros estimamos que la heredabilidad de los niveles de FVIII era del 40% (Souto *et al.*, 2000b) y demostró, mediante un análisis de ligamiento, que el *locus* del grupo sanguíneo del sistema ABO tiene efectos funcionales sobre los niveles plasmáticos de vWF y FVIII (Souto *et al.*, 2000c). En concreto, los individuos con el grupo no-O mostraban unos valores de FVIII y vWF más elevados que los del Grupo O (Souto *et al.*, 2000c).

También observamos una correlación genética significativa entre los niveles de FVIII y de vWF y la susceptibilidad a la trombosis (Souto *et al.*, 2000a).

Considerando los datos previos aportados por el proyecto GAIT, el objetivo de este trabajo fue investigar en un estudio caso-control (ver métodos, página 71) la posible asociación de las variables, grupo sanguíneo del sistema ABO, niveles de FVIII y niveles de vWF respecto a la trombosis venosa en población española. Hay que destacar que el grupo sanguíneo lo analizamos mediante el estudio del genotipo *ABO*, en lugar del fenotipo. El genotipo es más informativo porque permite distinguir entre 6 tipos de individuos (*OO*, *OA*, *OB*, *AB*, *AA*, *BB*) mientras que el fenotipo sólo permite distinguir 4 tipos de individuos (O, A, B, AB).

Niveles de FVIII, de VWF y Grupo del sistema ABO. En primer lugar observamos que los niveles de FVIII y vWF era significativamente más elevados ($p < 0.0001$) en individuos con el genotipo *no-O* que en aquellos con el genotipo *Grupo O* (tabla 1 del trabajo). No había diferencias entre los Grupos A, B y AB y tampoco encontramos diferencias entre los niveles de FVIII y vWF entre individuos homocigotos y heterocigotos (*AA versus AO* y *BB versus BO*). Un dato importante observado en este trabajo fue que los individuos con el genotipo *A₂O* mostraban niveles de FVIII y de vWF inferiores a aquellos individuos con otros Grupos A y similar que el Grupo O. También observamos como los niveles de FVIII y vWF eran más elevados ($p < 0,002$) en individuos del Grupo A con el genotipo *A₁* (*A₁A₁*, *A₁A₂*, *A₁O₁*, *A₁O₂*), del Grupo B y del Grupo AB que aquellos individuos con el genotipo *A₂O* o *OO* (tabla 1 del trabajo).

El Grupo O era más frecuente en los controles que en los pacientes (44,3% respecto 23,3%; diferencia de un 21,1%; IC 95%: 13,0-29,3%). Sin embargo, el Grupo A era más frecuente en los pacientes que en los controles (59,2% respecto 41,8%; diferencia del 17,7%, IC 95%: 9,1-26,4) especialmente en aquellos que eran portadores del *alelo A₁* (55,4% respecto a 34,4%; diferencia de 21,0%, IC 95%: 12,4-29,6). No observamos diferencias significativas entre los Grupos B y AB, pero el Grupo AB era menos frecuente en los controles que en los pacientes (tabla 2 del trabajo). Los pacientes con trombosis venosa mostraban niveles de FVIII más elevados que los controles ($200,1 \pm 75,9\%$ respecto $151,9 \pm 57,7\%$). Esta diferencia no era atribuible al efecto del grupo sanguíneo ya que cuando se analizó en función del grupo sanguíneo, se encontraron también diferencias entre los niveles de los pacientes respecto a los controles. Esta diferencia era más evidente

en los individuos con el grupo O y A_2O . La figura 1 del trabajo muestra los niveles de FVIII en función del grupo sanguíneo. Los niveles de vWF eran más elevados en los pacientes que en los controles ($154,9 \pm 64,2\%$ versus $134,2 \pm 56,2$) y los niveles más elevados lo mostraban también los individuos con grupo no-O.

Riesgo de trombosis. Al estudiar el riesgo de trombosis de los diferentes grupos sanguíneos encontramos que los individuos no-O asociaban un mayor riesgo de trombosis (OR: 2,6; IC 95%:1,8-3,8) que aquellos individuos con Grupo O. Cuando comparábamos el Grupo O respecto al Grupo A, el riesgo de trombosis se mantenía sin cambios (OR: 2,7), probablemente porque el Grupo A sea el principal grupo responsable del riesgo. Además, si excluíamos los individuos con el genotipo A_2O del Grupo A, el riesgo de padecer trombosis de los individuos con el *alelo* A_1 incrementaba ligeramente (OR: 3,1). Considerando el grupo A_2O y el Grupo O juntos, el riesgo era similar (OR: 3,1). Estos resultados indican que el *alelo* A_1 es responsable del riesgo a padecer trombosis y que el genotipo A_2O se comporta como el Grupo O. No observamos diferencias entre los grupos AB y B, probablemente porque estos grupos sanguíneos son poco frecuentes en nuestra población.

Cuando realizábamos el cálculo del riesgo que suponía el Grupo sanguíneo mediante el ajuste por FVIII y vWF en un análisis por regresión logística, el riesgo de trombosis para los grupos no-O (OR: 2,6; IC95% 1,8-3,8) o para los portadores del *alelo* A_1 (OR: 3,1; IC 95%: 2,0-4,7) respecto al Grupo O se mantenían significativos, OR: 1,7 y OR: 2,0 respectivamente (tabla 3 del trabajo). Sin embargo el riesgo del vWF (niveles $>162\%$, percentil 90; OR: 2,8 IC 95%: 1,7-4,8) desaparecía después de ajustar por el tipo de grupo sanguíneo (OR: 0,6 IC 95%: 0,3-1,3), mientras que el FVIII (niveles $>190\%$; OR: 9,5 IC 95%. 4,9-18,3) permanecía similar (OR: 9,5). Finalmente analizamos los niveles de FVIII elevados (percentil 90: 232%) y de vWF (percentil 90: 202%) y grupo sanguíneo (como grupo no-O respecto grupo O) en una regresión logística ajustando por otros factores implicados en la trombofilia (AT, PC, PS, la mutación PT20210A, el polimorfismo C46T del gen *F12* y la RPCa). Los resultados mostraron como el riesgo de trombosis debido a los niveles elevados de FVIII (OR: 3,7) y los grupos no-O (OR: 2,1) permanecían significativos. El riesgo atribuido a los niveles de vWF desaparecía después del ajuste. Por otro lado al incluir en el análisis la RPCa, el riesgo atribuido a los niveles elevados de FVIII disminuía ligeramente (3,2; IC 95%: 1,7-5,4) mientras que el riesgo de

los grupos no-O permanecía sin cambios. Además observamos que el riesgo de los niveles de FVIII era continuo, de manera que los pacientes con niveles más elevados, mostraban más riesgo (tabla 3 del trabajo). Al analizar la trombosis recurrentes observamos como los pacientes con niveles superiores a 232% (percentil 90) mostraban dos veces más riesgo (OR 2,3; IC 95%: 1,3-4,1) de recurrencia que aquellos con los niveles más bajos, corroborando los resultados descritos por otros grupos (Kraaijenhagen *et al.*, 2000; Kyrle *et al.*, 2000). Según los resultados de nuestro estudio, el punto de corte de 232% en los niveles de FVIII plasmáticos, podría representar un valor de relevancia en la práctica clínica en nuestro medio.

Cuando teníamos en cuenta el ajuste del análisis con el fenotipo de la RPCa, el riesgo debido al FVIII disminuía ligeramente, sugiriendo una correlación entre los dos rasgos. Estos resultados verifican los resultados obtenidos por nuestro grupo que localizaron un nuevo *locus* en el cromosoma 18 que influye a la vez sobre el fenotipo de la RPCa, los niveles elevados de FVIII y el riesgo a la trombosis (Soria *et al.*, 2003). Sin embargo, aunque se ajuste por la RPCa el riesgo de los niveles de FVIII sigue siendo de hasta 3 veces más (OR: 3,1) sugiriendo que existen otros efectos genéticos que subyacen para estos dos fenotipos.

En el caso de los niveles del vWF el riesgo observado desaparecía al ajustar por el grupo del sistema ABO en los análisis, apoyando los resultados del proyecto GAIT donde se observó que los niveles de vWF estaban asociados al grupo ABO (Souto *et al.*, 2000c). Los niveles elevados de vWF encontrados en los pacientes en el estudio caso-control podrían ser debidos a la alta proporción de los grupos no-O en los pacientes respecto a los encontrados en el grupo control.

Recientemente se ha descrito por O'Donnell *et al* (O'Donnell *et al.*, 2000) una posible explicación del mecanismo fisiológico de la asociación de los niveles del vWF con el grupo sanguíneo ABO, basada en que el vWF es una glicoproteína compleja que tiene estructuras que incluyen residuos de oligosacáridos similares a las que están presentes en las moléculas del grupo sanguíneo. El grupo sanguíneo ABO podría estar afectando a la concentración de vWF por una modificación en el proceso de eliminación o el de catabolismo de vWF. Los alelos A y B del *locus ABO* codifican para las correspondientes glicosiltransferasas A y B, convirtiendo el antígeno precursor H en determinantes A y B por conjugación de monosacáridos. El Grupo O no presenta este enzima transferasa y por

ello expresa sólo la estructura H básica. En nuestro estudio de asociación encontramos que los niveles de FVIII y vWF son significativamente más altos en pacientes con A_1A_1 que en aquellos con A_2O_1 o OO , corroborando los resultados descritos por *O'Donell et al* (*O'Donell et al.*, 2002), donde describieron que los niveles de la actividad transferasa en los individuos con A_2O eran más bajos. En este estudio demostraron que el alelo A_2 difería del A_1 por una delección producida en la zona del codón stop, dando lugar a una molécula de transferasa más larga y menos eficiente en convertir la estructura H básica en antígenos del Grupo A. Además observaron como la cantidad del antígeno A expresado por unidad de vWF era significativamente más alta en A_1A_1 y A_1O_1 que en A_2O_1 . Nuestros resultados confirman estos datos ya que los individuos con A_2O presentan niveles similares de FVIII y vWF que aquellos con el grupo O. Por otro lado una eliminación diferente de la proteína del vWF podría explicar la variabilidad de los diferentes niveles de vWF encontrados entre los grupos del sistema ABO. Recientemente, *Bowen* (*Bowen* 2003) publicó un trabajo donde mostraba como el Grupo del sistema ABO influía en la actividad del enzima ADAMTS-13 (tipo metaloproteasa) en su acción proteolítica sobre la molécula vWF. En este trabajo *Bowen* describió como la susceptibilidad del vWF al ADAMTS-13 disminuía en función del grupo sanguíneo, en concreto en el orden: $O > B > A = AB$. De esta manera los grupos que incluían A mostraban un mayor efecto protector sobre el vWF y como resultado incrementa sus niveles plasmáticos.

En conclusión, nuestro estudio confirma que los niveles de FVIII y el grupo sanguíneo tipo no-O, probablemente aquellos portadores del *alelo A1*, son factores independientes de riesgo del tromboembolismo venoso en la población española. De este modo, los niveles de FVIII y la presencia del *alelo A1* deberían ser considerados en la evaluación de los pacientes con trombofilia, y en el caso del FVIII, puede ser especialmente útil para valorar el riesgo de trombosis recurrente.

DISCUSIÓN CONJUNTA

Los estudios realizados que forman parte de esta tesis, han investigado diversos aspectos fenotípicos, genéticos y clínicos relacionados con las anomalías hereditarias que se han asociado a la enfermedad tromboembólica. Actualmente, la trombofilia hereditaria se considera como una enfermedad multifactorial y compleja en la que interactúan múltiples genes entre sí y a la vez con factores ambientales (Rosendaal 1999; Bertina 2001). Estas interacciones generan en cada individuo un gradiente de predisposición a padecer trombosis, o lo que es lo mismo, determinan la susceptibilidad a desarrollar episodios trombóticos (Rosendaal 1999, Bovill *et al.*, 1999).

Pese a los grandes esfuerzos invertidos en la última década en el estudio de la enfermedad trombótica, nuestros conocimientos sobre la base molecular de esta patología son aún escasos, más si se tiene en cuenta que en el 60% de la predisposición a la trombosis es atribuible a factores genéticos (Souto *et al.*, 2000b). Para ilustrar esta situación basta recordar los resultados obtenidos en un estudio multicéntrico realizado en nuestro país, el estudio EMET (Estudio Multicéntrico Español de Trombofilia). Estudio en el que participaron 2.154 pacientes consecutivos, no seleccionados, con tromboembolismo venoso en cualquier localización y se observó que sólo el 12,85% de los casos presentaban algún defecto conocido (Mateo *et al.*, 1997). Además, estos factores genéticos de riesgo trombótico sólo se identificaban, en el mejor de los casos y dependiendo de la población estudiada, en el 60% de las familias con trombofilia (Mateo *et al.*, 1998).

Uno de los objetivos actuales es identificar los factores genéticos de riesgo trombótico en el 40% de las familias restantes, portadoras de trombofilia inexplicada o idiopática ya que no presentan ninguno de los factores biológicos conocidos asociados a la enfermedad tromboembólica. Una vez identificados estos factores se ha de estudiar y determinar la contribución de los mismos, al riesgo de padecer la enfermedad en nuestro medio.

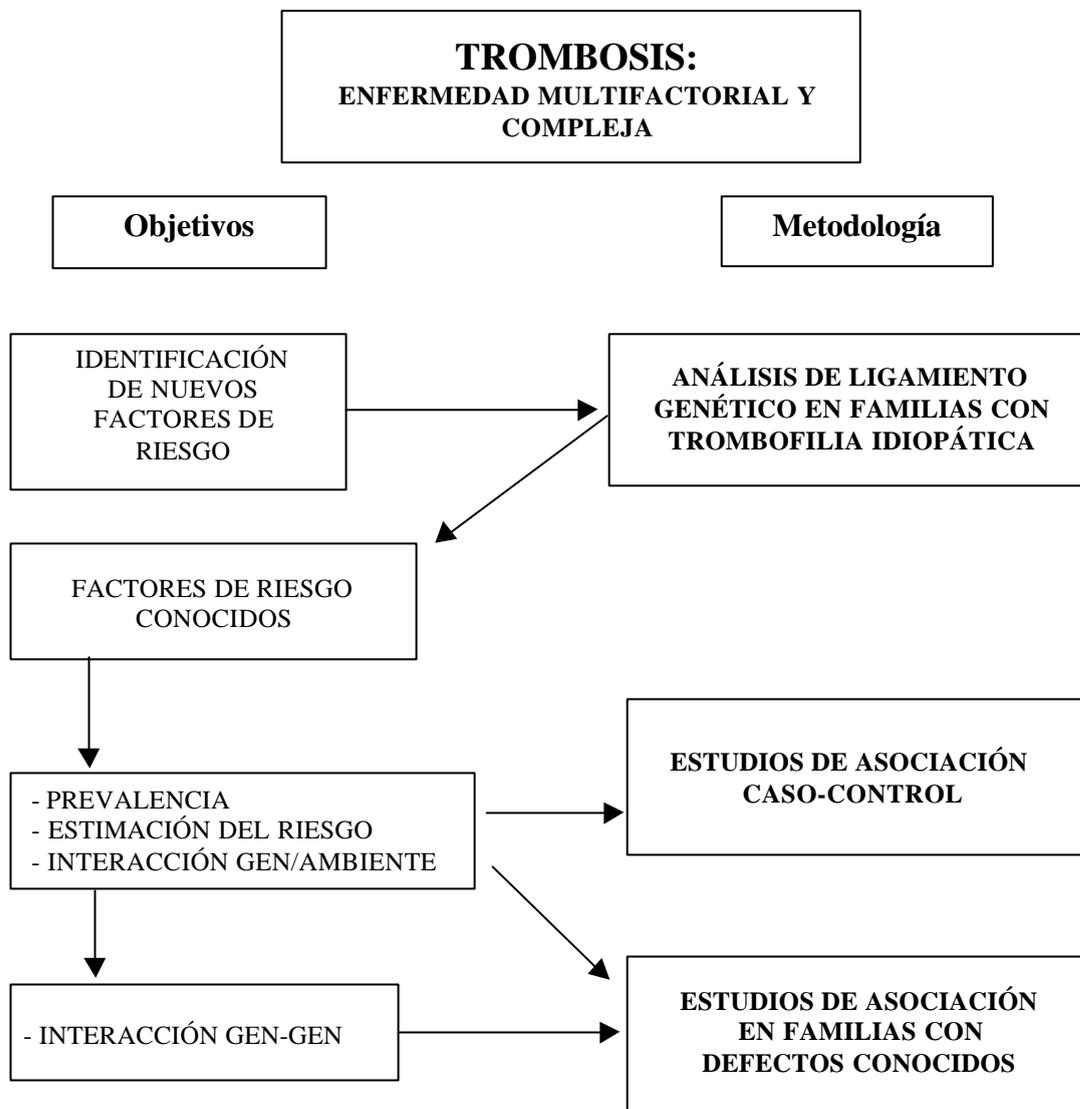
Teniendo en cuenta esta componente multifactorial y compleja de la enfermedad tromboembólica, hemos abordado el estudio de sus causas genéticas desde diversos enfoques metodológicos a partir del diseño de diferentes estudios (ver figura nº7). Este enfoque con estudios complementarios constituye, en su conjunto, la base fundamental en la que se sustentan los más avanzados análisis de las enfermedades complejas (Almasy y McCluer, 2002).

El esquema general que nos planteamos en este trabajo es un proceso continuo desde el punto de vista teórico, aunque puede desarrollarse paralelamente desde el punto de

vista metodológico. La primera fase, incluye la identificación de nuevos factores genéticos de riesgo tromboembólico a partir de un análisis de ligamiento genético realizado en familias con trombofilia idiopática (proyecto GAIT). Esta fase, y como trabajo de esta tesis, nos ha permitido aportar la primera evidencia genética que la mutación PT20210A en el gen de la protrombina es un factor de riesgo tromboembólico. Además, gracias a esta estrategia, hemos podido analizar otros factores genéticos de riesgo trombótico en nuestros estudios posteriores, todos ellos identificados como parte de los resultados del proyecto GAIT. Por ejemplo, destacaríamos el grupo sanguíneo del sistema ABO (Souto *et al.*, 2000c) o el polimorfismo C46T en el gen del *F12* (Soria *et al.*, 2003). En una segunda fase, analizamos el riesgo de trombosis venosa asociado a cada uno de estos factores genéticos y su prevalencia en nuestra población, mediante un estudio de asociación caso-control. En tercer y último lugar, analizamos la posible interacción entre dos o más factores genéticos de riesgo tromboembólico, mediante el estudio retrospectivo de asociación en familias con trombofilia asociadas a algún defecto conocido. Este tipo de estudio permite demostrar el efecto sinérgico de alguno de estos factores en el riesgo de trombosis, como es el caso de la asociación de la mutación FVL a las deficiencias de AT, PC o de PS. Paralelamente, en los dos estudios anteriores (caso-control y en el de asociación en familias) analizamos la interacción de estos factores genéticos con factores ambientales (por ejemplo, el uso de anticonceptivos orales).

Esta estrategia global, con diferentes enfoques metodológicos para abordar el estudio de una enfermedad compleja, supone un cambio radical en la estrategia actual para estudiar la trombofilia hereditaria.

Figura nº 7. Diseño de la estrategia utilizada para abordar el estudio de la trombofilia hereditaria.



El estudio de la trombofilia, antes de la actual revolución en el análisis genómico y de los avances en estadística genética y en computación, se basaba en dos tipos de enfoques metodológicos. El primero basado en la asociación de la clínica trombótica con fenotipos funcionales, principalmente deficiencias hereditarias seleccionadas sobre la base de su defecto en la formación o degradación de la fibrina en el contexto del balance hemostático. Este diseño ha sido útil para identificar y analizar los genes responsables de las deficiencias de AT, PC o PS. Sin embargo, fue más difícil llegar a identificar el factor genético responsable del fenotipo RPCa.

Y el otro enfoque, estudios de asociación caso-control, básicamente investiga la frecuencia de factores de riesgo en individuos sanos (controles) y enfermos (casos) no emparentados entre ellos. En realidad estos estudios sólo son útiles para analizar fenotipos relacionados directamente con la enfermedad o en la valoración de factores genéticos conocidos, como son los polimorfismos descritos en genes estructurales que codifican para las proteínas de la hemostasia.

Así, en 1993 Dahlbäck y *et al* (Dahlbäck *et al.*, 1993), identificaron un fenotipo implicado en la trombofilia. Este defecto, la RPCa, producía una disminución en la respuesta anticoagulante de la PC activada (Dahlbäck *et al.*, 1993). Después de una cuidadosa selección de genes candidatos a partir de una sólida base fisiológica, seguido de un análisis de ligamiento genético en una familia con el fenotipo de RPCa, se demostró que este fenotipo estaba causado por una mutación en el exón 10 del gen *F5* (G1691A). Concretamente, una sustitución de la Arg506 por Gln, conocida como mutación FVL (Bertina *et al.*, 1994).

Como parte de esta tesis analizamos el fenotipo RPCa en nuestro estudio caso-control, debido a que había una evidencia previa de funcionalidad fisiológica. Los pacientes con RPCa mostraban un incremento de riesgo de trombosis de más de 6 veces respecto a los controles, resultados similares a los obtenidos en otros estudios en otras poblaciones (Lensen *et al.*, 2000; Middeldrop *et al.*, 1998; Hille *et al.*, 1997). Sin embargo, se observó por primera vez cómo estos pacientes, independientemente de si eran portadores de la mutación FVL o no, mostraban una clara disminución de RPCa respecto a los controles. Estos resultados fueron confirmados ese mismo año por el grupo de De Visser *et al* (De Visser *et al.*, 1999). Es de destacar, que nuestros resultados mostraban una relación inversa entre los valores de medidas de la RPCa (ratio rPCA) y el riesgo a padecer

trombosis venosa, que se mantenía después de excluir los individuos con un claro fenotipo de RPCa patológico. Esto implicaba la posibilidad de la existencia de otros factores genéticos o adquiridos que podían estar contribuyendo a esa respuesta anómala a la PCa. Esta hipótesis ha sido recientemente confirmada por nuestro grupo como parte de los resultados obtenidos en el proyecto GAIT Soria *et al.* (Soria *et al.*,2003) donde se ha descrito un nuevo QTL en el cromosoma 18 que influye sobre el fenotipo de la RPCa y sobre los niveles plasmáticos de FVIII y que presenta una clara relación con la susceptibilidad a padecer trombosis venosa. En este QTL del cromosoma 18 relacionado con el fenotipo de la RPCa no existe ningún gen candidato relacionado con la trombosis, por ello este nuevo *locus* parece representar un nuevo factor de riesgo trombótico. Por otro lado, el fenotipo de la RPCa también podría estar causado por mutaciones en lugares críticos del gen *F8*, sin embargo hasta el momento no se han identificado mutaciones en este gen en pacientes con trombofilia y RPCa (Lane y Grant 2000).

En este mismo estudio del análisis del fenotipo RPCa, nuestros resultados mostraron que los tiempos de APTT fueron inferiores en los pacientes que en los controles y estaban inversamente correlacionados con la edad, si bien las razones de APTT y de RPCa se mostraron independientes. Una de las posibles explicaciones del porqué las razones de APTT eran inferiores se ha podido constatar con posterioridad, ya que los pacientes con trombosis muestran cifras de FVIII superiores (Kamphuisen *et al.*,1999; Rosendaal 2000) y este factor es uno de los más influyentes en el APTT.

Otro de los objetivos planteados en este trabajo fue establecer la prevalencia de la RPCa en nuestro medio que, tras excluir pacientes con anticoagulante tipo lúpico, era de un 12,8 % en pacientes y del 3,9 % en el grupo control. Por otro lado, la prevalencia de la mutación FVL fue del 9,1 % en los pacientes y 1,9% en controles. La medida de la RPCa, además de ayudar en la detección de portadores de la mutación FVL, puede ser de utilidad para evaluar el riesgo de trombosis, ya que observamos una correlación continua e inversa entre las cifras de RPCa y el riesgo trombótico. Estos datos concuerdan con la intensa correlación genética entre la RPCa y la trombosis estimada en el proyecto GAIT, indicando que algunos de los genes que están influyendo en la variación cuantitativa de este fenotipo también influyen en la susceptibilidad a la trombosis (Soria *et al.*, 2003).

Otro resultado relevante, a partir de nuestro estudio, es que otros polimorfismos del gen *F5* localizados en el exón 13 (dominio B de la molécula del FV) no tenían ningún

papel funcional sobre las variaciones de los niveles de FV o sobre el fenotipo de la RPCa en la población española. Estos resultados se obtuvieron a partir del estudio exhaustivo de una familia del proyecto GAIT, que presentaba una delección de toda esta región del gen *F5*. En estudios previos se había descrito que las alteraciones en el dominio B de la molécula del FV producían una disminución de la actividad del FV y podían llegar a producir una pérdida de funciones procoagulantes o anticoagulantes en la proteína del FV (Kane *et al.*, 1990). Sin embargo, el alelo portador de la delección (3997-4104EX13) del exón 13 expresaba proteína, dando como resultado una proteína de FV funcional. Hipotéticamente, esta delección podría tener un papel relevante ya que incluía entre otras variantes genéticas el polimorfismo A4070G (exón 13 del gen *F5*) asociado previamente al fenotipo de la RPCa (Bernardi *et al.*, 1997) y a una disminución leve de los niveles de FV (Lunghi *et al.*, 1996). Clínicamente, incluso se había descrito que los portadores del alelo 4070G presentaban un incremento del riesgo a padecer trombosis venosa (Alhenc-Gelas *et al.*, 1999). Sin embargo, nuestro estudio no corroboró ninguno de estos resultados, demostrado las limitaciones de los estudios de asociación, en la determinación de la importancia de variantes genéticas, de las cuales no se tiene información previa de su funcionalidad fenotípica (Weiss *et al.*, 1993).

En los métodos clásicos de estudios caso-control, cuando se analiza uno o varios polimorfismos conocidos, se está asumiendo que son funcionales pero la mayor parte de la variabilidad en esos genes candidatos es desconocida. Muchas veces no existe ninguna evidencia fisiológica o bioquímica de que el polimorfismo analizado sea funcional (Gambaro *et al.*, 2000). En cambio, este tipo de estudios de asociación son una herramienta indispensable para, una vez identificada la variante genética que está implicada en la enfermedad, poder determinar la implicación sobre el riesgo de la enfermedad en nuestro entorno (Almasy y McCluer, 2002).

En nuestra estrategia global hemos utilizado los resultados provenientes del proyecto GAIT como base científica, para analizar los nuevos factores genéticos de riesgo tromboembólico identificados a partir de este estudio. El proyecto GAIT se basa en el análisis de ligamiento genético en estudios familiares, que permiten demostrar la cosegregación dentro de una familia con una enfermedad de las variantes genéticas responsables. Este tipo de estudio genera resultados que pueden llegar a establecer relaciones inequívocas de causa-efecto. También permiten analizar genes candidatos, y a

diferencia de los estudios de asociación, permiten detectar genes desconocidos implicados en el riesgo a padecer la enfermedad (Weiss 1993; Almasy y Blangero 1998; Blangero *et al.*, 2003). Esta estrategia es la única que permite localizar las regiones cromosómicas (*loci*) que contienen genes que influyen en la variabilidad del fenotipo bajo estudio (QTL). Sin embargo, una de las limitaciones de los análisis de ligamiento es que una vez identificado el factor genético, no puede cuantificar el riesgo a padecer la enfermedad que ese factor confiere a los portadores. Tampoco puede cuantificar la prevalencia en individuos afectados, ni estimar posibles interacciones gen-gen o gen-ambiente. Es aquí donde los estudios de asociación pueden responder a todas estas cuestiones. Por lo tanto, dentro de la estrategia global utilizada en este estudio, ambos diseños son complementarios (ver figura 7).

El resultado de esta tesis doctoral que mejor muestra la estrategia global utilizada es el análisis de la variante alélica C46T en el gen *F12*. De todos los fenotipos analizados en el proyecto GAIT, los niveles de FXII en plasma mostraron una de las heredabilidades más altas (67%) y una correlación genética con la enfermedad tromboembólica (Souto *et al.*, 2000b). Estos resultados mostraron la gran importancia de los factores genéticos en la determinación de la variabilidad de esta proteína en plasma, y mucho más relevante, algunos de estos factores genéticos determinarían al mismo tiempo la variabilidad de los niveles de FXII y el riesgo trombótico (Souto *et al.*, 2000b). De esta manera, los resultados obtenidos en el análisis de ligamiento genético posterior, han permitido demostrar que el gen estructural *F12* está implicado en la variabilidad plasmática de los niveles de FXII y en la susceptibilidad a la trombosis. Además, la variante genética C46T localizada dentro del gen *F12*, mostró una señal de ligamiento altamente significativa, demostrando de manera inequívoca que el polimorfismo C46T determina al mismo tiempo la variabilidad de los niveles de FXII y el riesgo trombótico (Soria *et al.*, 2002).

Kanaji y colaboradores (Kanaji *et al.*, 1998) demostraron, mediante un ensayo *in vitro* de análisis de transcripción/traducción, como la cantidad producida de FXII era inferior a partir de ADNc que contenía de alelo 46T que el que se producía a partir del que contenía el alelo 46C. Probablemente debido a que este polimorfismo se encuentra situado cerca de la señal de inicio de traducción de proteína (metionina inicial), produciendo un inicio alternativo y dando lugar a un codón *stop* después de la traducción de tan sólo tres

aminoácidos, generando una proteína truncada no funcional. Este estudio demostraba que el polimorfismo C46T era funcional y afectaba directamente a los niveles de FXII.

Para profundizar en la implicación de este polimorfismo C46T en el riesgo tromboembólico, el siguiente paso, como en el resto de factores genéticos presentados en este trabajo, ha sido analizar su prevalencia y el riesgo de trombosis en la población española mediante un estudio caso-control. Los resultados obtenidos mostraron como individuos homocigotos mutados (T/T) para este polimorfismo C46T del gen *F12*, presentaban un riesgo casi 5 veces superior de padecer trombosis venosa. Así, sobre la base de estos resultados parece prudente plantearse la posibilidad de añadir este nuevo factor de riesgo genético, el polimorfismo C46T, a la lista de los factores de riesgo que actualmente se conocen y se analizan para el estudio de los pacientes con trombosis venosa.

El FXII es una serinoproteasa del sistema de contacto que juega un papel en los sistemas de coagulación y fibrinólisis. Desde que se describió que el FXIIa actuaba como activador del plasminógeno (Braat *et al.*, 1999), se ha observado que la disminución de niveles plasmáticos de FXII podría desencadenar una trombosis como resultado de un sistema fibrinolítico deficiente. Sin embargo, la función biológica del FXII es controvertida y faltan por conocer muchas de las reacciones en las que interviene. En nuestro estudio, observamos que los niveles plasmáticos bajos de FXII (<71%) mostraban una tendencia a incrementar el riesgo de trombosis. Se requieren otros estudios para poder llegar a definir la prevalencia y los niveles de FXII en otras poblaciones, así como la implicación en el riesgo de trombosis del polimorfismo C46T. Actualmente nuestro grupo está llevando a cabo el estudio de la posible interacción de este polimorfismo C46T en el grupo de familias con trombofilia que asocian un defecto conocido, como son las deficiencias de AT, PC, PS, mutaciones del FVL y la PT20210A.

Debido a la relevancia en la clínica trombotica del polimorfismo C46T en el gen *F12* en nuestro entorno, nos planteamos la necesidad de desarrollar un método rápido, sencillo y reproducible para poder llevar a cabo su genotipación. El método elegido fue el termociclador en tiempo real (LightCycler PCR, Roche). Esta técnica se validó respecto al método convencional, de análisis de fragmentos de longitud polimórfica con el enzima de restricción endonucleasa *SfnaI*. Los resultados obtenidos por este nuevo método demostraron una elevada fiabilidad. Cuando este método se asociaba a una extracción rápida, el resultado se podía obtener en 60 minutos desde la llegada de la muestra, en

contraposición a las 48 horas del método clásico mediante enzima de restricción. Este nuevo método puede ser muy útil para el trabajo de análisis rutinario en un laboratorio convencional.

Otro resultado relevante de este trabajo donde se ilustra la complementariedad de nuestro enfoque metodológico, es el estudio de la mutación PT20210. Previamente a nuestro estudio, se había analizado el gen de la protrombina como uno de los genes candidatos a explicar el riesgo de trombofilia. Este análisis se realizó secuenciando las regiones codificantes y los extremos 5' y 3' del gen en *propositi* de familias con trombofilia inexplicada. Gracias a esta estrategia, se identificó la variante alélica PT20210A en la región 3' del gen de la protrombina (Poort *et al.*, 1996). En el posterior estudio de asociación, se observó que la frecuencia de este polimorfismo era más alta en pacientes con trombofilia que en controles sanos (Poort *et al.*, 1996). Recientemente, como resultado del análisis de ligamiento genético en las familias del proyecto GAIT, y como parte de esta tesis, determinamos que es esta mutación PT20210A, y no otra alteración genética en desequilibrio de ligamiento con ella, la que determina la variabilidad de los niveles de protrombina y en la susceptibilidad a la trombosis. Con este análisis hemos demostrando estadísticamente que la variante genética PT20210A es funcional, aunque su mecanismo fisiopatológico es actualmente desconocido. A partir de estos datos, y con la certeza que esta variante alélica esta implicada directamente en el riesgo tromboembólico, pudimos determinar en el estudio caso-control que este polimorfismo representa un riesgo de hasta 4 veces superior (OR: 4,1) de desarrollar un accidente tromboembólico en los portadores de esta variante alélica.

Para profundizar en el análisis de la implicación de la PT20210A en el riesgo de padecer trombosis, el siguiente paso fue analizar esta mutación en familias trombofílicas portadoras de otros defectos genéticos implicados en el riesgo de trombosis. Es precisamente en este tipo de estudios donde, a lo largo de los últimos años, se demuestra que la enfermedad tromboembólica es un rasgo complejo. De manera que diferentes mutaciones, en diferentes genes, pueden contribuir al riesgo de padecer la enfermedad, pero pueden mostrar diferentes tipos de fenotipos clínicos como son, trombosis venosa profunda, embolismo pulmonar, tromboflebitis superficial etc. (Bertina 2001). Además, a partir de estudios de asociación en familias con trombofilia con deficiencias asociadas de AT, PC o PS, se ha podido observar como la penetrancia de la enfermedad es incompleta

de manera que, en aquellos individuos portadores de una determinada mutación, su expresión clínica depende de la presencia de otros factores genéticos o ambientales (Zoller *et al.*, 1998; Martinelli *et al.*, 1998a). En general, en estas familias se observan varias posibilidades, por un lado individuos sintomáticos portadores de un defecto asociado, y por otro, individuos portadores de este defecto y que hasta el momento del estudio son asintomáticos. También se observan familiares de estos individuos que presentan clínica trombótica pero que no son portadores del defecto que cosegregan en esta familia, indicando la presencia de otros factores genéticos de riesgo tromboembólicos sin identificar. Desde el punto de vista clínico, los individuos portadores de dos o más defectos muestran más riesgo de trombosis y la presencia de clínica trombótica sucede a una edad más temprana respecto a los individuos de la misma familia que asocian un sólo defecto (Bertina 2001). Estos resultados se observan de manera independiente al defecto genético asociado al riesgo a padecer la enfermedad.

El estudio que hemos realizado como parte de este trabajo, incluía familias con trombofilia que asociaban defectos como AT, PC, PS, la mutación FVL o la mutación PT20210A. Los objetivos del estudio, eran analizar el riesgo trombótico de estos defectos de manera aislada y estudiar el riesgo que podía llegar a producir al interaccionar cada uno de estos defectos con la mutación FVL o la mutación PT20210A.

En primer lugar, se observó una mayor prevalencia de estas mutaciones en estas familias en comparación con la frecuencia observada en la población general, probablemente debido a que los individuos que presentan más de un factor de riesgo asociado presentan más clínica trombótica y tienen más posibilidades de ser estudiados. En segundo lugar, nuestro estudio fue el primero que analizó familias con trombofilia que asociaban la mutación PT20210A como defecto aislado y las comparaba con el riesgo a la trombosis en familias que asociaban otros defectos. Una de las principales observaciones fue que las familias que asociaban la mutación PT20210A, era el grupo que presentaba un riesgo inferior (OR: 4,2) respecto a familias con AT (OR:10,6), PC (OR:6,4), PS (OR:7,6) y FVL (OR:6,2). También observamos como las familias con la mutación de la PT20210A de forma aislada, presentaban menos frecuencia de trombosis recurrentes que el resto de familias con otros defectos. En tercer lugar, pudimos analizar el efecto aditivo que se producía cuando coexistían varios factores de riesgo en un mismo individuo. Así observamos un incremento de riesgo en aquellas familias con deficiencias en AT, PC o PS

que asociaban la mutación FVL, respecto a las que mostraban sólo la deficiencia de AT, PC o PS de forma aislada. Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos por otros grupos en otras poblaciones (Van Boven *et al.*, 1996; Koeleman *et al.*, 1995). En cambio, en el caso de la interacción de la mutación PT20210A, ésta mostraba un incremento de riesgo al asociarse con deficiencias de AT, de PS o con la mutación FVL respecto a las que presentan AT, PS o FVL de manera aislada y no mostraba incremento de riesgo al asociarse con la deficiencia de PC. La falta de interacción entre la mutación PT20210A y la deficiencia en PC también se ha observado en otros estudios realizados por otros grupos (Bertina 2000). Estos resultados son interesantes ya que demuestran que no todas las combinaciones de factores genéticos llegan a mostrar interacción e indican que seguramente la mutación PT20210A representa un factor de riesgo más débil que la mutación FVL.

En este tipo de estudios de asociación en familias se puede analizar la interacción de los factores genéticos con los diferentes factores ambientales. Así, y de acuerdo con los datos descritos por otros grupos (Helmerhorst *et al.*, 1997), nuestros resultados mostraron una asociación entre el uso de anticonceptivos orales y mayor riesgo de trombosis venosa en las mujeres portadoras de las mutaciones FVL y la PT20210A. Basándonos en estos datos, creemos que sería adecuado el análisis de ambas mutaciones en aquellas mujeres que quieran iniciar el uso de anticonceptivos orales y que pertenezcan a una familia con trombofilia.

Otro dato clínicamente relevante, es que la coexistencia de las mutaciones FVL y PT20210A asociadas a otro defecto tienden a incrementar el riesgo de trombosis recurrentes (De Stefano *et al.*, 1999). En este sentido, nuestro estudio confirma la mayor frecuencia de trombosis recurrente en familias portadoras de más de un defecto.

Como parte de este trabajo, presentamos la primera familia con trombofilia que asociaba el polimorfismo C46T del gen *F12* a otros defectos. En concreto la *propositus* es doble heterocigota para la mutación FVL y la PT20210A y homocigota para el alelo T del polimorfismo C46T. Esta familia representa un claro ejemplo de la enfermedad tromboembólica como rasgo multifactorial y complejo. Los valores del fenotipo RPCa en esta familia, mostraron valores normales, a pesar de ser portadores de la mutación FVL. Estos datos corroboran los resultados obtenidos en el primer trabajo de esta tesis, donde demostramos que la RPCa es un factor de riesgo de trombosis independiente del FVL.

Finalmente, esta familia muestra uno de los principales problemas de la medicina actual cuando se analizan factores trombofílicos en pacientes con trombosis venosa: la duración del tratamiento y la necesidad de profilaxis en determinadas situaciones de riesgo (Bauer 2003). Se requieren estudios prospectivos, de los nuevos factores de riesgo genéticos descritos, para valorar si los individuos asintomáticos, con algún defecto asociado a trombofilia, requieren o no algún tratamiento de profilaxis en determinadas situaciones de riesgo (Bauer 2003).

De manera similar a los factores anteriormente citados en esta memoria, se analizaron los niveles de FVIII, los niveles del vWF y se determinó el grupo sanguíneo del sistema ABO en nuestra población. Desde 1960, muchos trabajos han evidenciado la relación entre el grupo sanguíneo del sistema ABO y los niveles de FVIII y de vWF mediante estudios de asociación (Osrtavick *et al.*, 1985; Koster *et al.*, 1995,). Como parte del proyecto GAIT, se demostró la alta heredabilidad de los niveles plasmáticos de FVIII (40%) y el efecto funcional que el *locus* ABO tenía sobre los niveles de vWF y FVIII (Souto *et al.*, 2000c). También, se estableció la alta correlación genética entre los niveles de FVIII y vWF, y la susceptibilidad a la trombosis (Souto *et al.*, 2000b).

A partir de estos datos estudiamos la prevalencia y el posible riesgo trombótico que representa cada uno de estos tres factores (niveles de FVIII, niveles de vWF y grupo sanguíneo del sistema ABO) en población española..

En primer lugar, observamos que los niveles elevados de FVIII y vWF eran más frecuente en pacientes con trombosis que en el grupo control, corroborando los resultados obtenidos por otros grupos (Koster *et al.*, 1995). A diferencia de otros estudios, analizamos el grupo del sistema ABO mediante análisis del genotipo en lugar del fenotipo, ya que era más informativo y permitía distinguir entre 6 tipos de individuos (*OO*, *OA*, *OB*, *AB*, *AA*, *BB*) mientras que el fenotipo sólo permite distinguir 4 tipos de individuos (O, A, B, AB). Nuestros resultados indican que los grupos no-O son más frecuentes en pacientes que en controles y, específicamente, los del Grupo A con el alelo A_1 . Por otro lado, observamos que los individuos con el genotipo A_2O eran más frecuente en el grupo control que en el grupo de pacientes.

En segundo lugar, los resultados obtenidos mostraban que el riesgo de trombosis debido a los niveles de FVIII era continuo, y que pacientes con niveles superiores al percentil 90 (232%) presentan el riesgo más elevado a sufrir de trombosis. Además, el

riesgo a padecer la enfermedad observado inicialmente con los niveles de vWF, desaparecía al ajustar el análisis por el FVIII y el grupo sanguíneo del sistema ABO. Es importante destacar que sólo los niveles elevados de FVIII se asociaron a trombosis recurrentes. De forma que los pacientes con niveles superiores a 232% (percentil 90), mostraban dos veces más riesgo de recurrencia que aquellos con los niveles más bajos, corroborando los resultados descritos por otros grupos (Kraaijenhagen *et al.*, 2000; Kyrle *et al.*, 2000). Según los resultados de nuestro estudio, el punto de corte de 232% en los niveles de FVIII plasmáticos, podría representar un valor de relevancia en la práctica clínica en nuestro medio.

Respecto al grupo sanguíneo del sistema ABO, nuestros resultados mostraron un incremento de riesgo en los grupos sanguíneos no-O, siendo probablemente el alelo A_1 el responsable del riesgo de trombosis venosa en nuestro medio, ya que los individuos con el genotipo A_2O se comportan como el Grupo O.

La posible explicación del mecanismo fisiológico de nuestros resultados viene reflejada en dos estudios recientes sobre la relación del vWF en función del grupo sanguíneo del sistema ABO. En primer lugar, O'Donnell *et al.* (O'Donnell *et al.*, 2000) describían una posible asociación de los niveles de vWF con el grupo sanguíneo del sistema ABO, basada en que el vWF es una glicoproteína compleja que tiene estructuras que incluyen residuos de oligosacáridos similares a las que están presentes en las moléculas que determinan el grupo sanguíneo. El grupo sanguíneo del sistema ABO podría estar afectando a la concentración de vWF por una modificación en el proceso de eliminación o el de catabolismo del vWF. En este estudio, demostraron que el alelo A_2 difería del A_1 en una delección producida en la zona que codifica para el codón *stop*, dando lugar a una transferasa más larga y menos eficiente en convertir la estructura H básica en antígenos del grupo A. Por otro lado, observaron como la cantidad de antígeno A expresado por unidad de vWF era significativamente más alta en A_1A_1 y A_1O_1 que en A_2O_1 . Nuestros resultados confirman estos datos ya que los individuos con el alelo A_1 , mostraban mayores niveles de FVIII y de vWF, y los individuos con A_2O presentan niveles inferiores de FVIII y vWF similar a aquellos con el grupo O. Así, una eliminación diferente de la proteína del vWF podría explicar la variabilidad de los diferentes niveles de vWF, encontrados entre los grupos sanguíneos del sistema ABO. Por otro lado, Bowen (Bowen 2003) publicó un trabajo donde mostraba como el grupo del sistema ABO influía en la

actividad del enzima ADAMTS-13 (tipo metaloproteasa), en su acción proteolítica sobre la molécula vWF. De manera que los grupos sanguíneos que incluían A mostraban un mayor efecto protector sobre el vWF y como resultado incrementaban sus niveles plasmáticos.

En resumen, los resultados de nuestro estudio muestran como los niveles elevados de FVIII y el Grupo no-O, probablemente el alelo A_1 , son factores de riesgo independientes para la susceptibilidad a la trombosis venosa en población española. De confirmarse estos resultados en otros estudios, deberían ser considerados también en el estudio biológico realizado en los pacientes con trombofilia y en el caso de los niveles de FVIII su medida puede ser útil especialmente en el caso de la prevención de trombosis recurrentes.

Recientemente varios autores, entre ellos una editorial de la revista científica *Nature Genetics* (Editorial *Nature Genet* 1999; Cooper *et al.*, 2002), han realizado propuestas sobre las características que debería cumplir los estudios de asociación para que sean considerado válidos en el análisis de factores genéticos de riesgo a padecer enfermedades complejas. En primer lugar, estos estudios deberían tener un tamaño de muestra grande, y los valores de significación estadística han de ser pequeños (valores P). El producto del gen portador del factor genético analizado debería tener alguna implicación fisiológica o biológica en la enfermedad. Por otro lado, estos estudios deberían incluir un análisis inicial basado en estudios familiares, como una replicación independiente de los datos.

En los resultados mostrados en este trabajo, el análisis de varios factores como son el FVL y el estudio de la RPCa; la mutación PT20210A y los niveles de protrombina; el polimorfismo C46T del gen *F12* y niveles de FXII; los polimorfismos del *locus* del grupo sanguíneo del sistema ABO, niveles de FVIII y niveles de vWF, satisfacen las recomendaciones propuestas en estas publicaciones. En primer lugar, se ha establecido que los factores analizados tienen una componente genética importante: la heredabilidad (Souto *et al.*, 2000b) y la existencia de una evidencia de ligamiento genético significativa entre las diferentes variantes genéticas analizadas y los diferentes fenotipos y la enfermedad. El estudio inicial era un estudio familiar y existían evidencias de que estos polimorfismos afectaban a la expresión del gen. Finalmente, en nuestro estudio de asociación caso-control, llevamos a cabo, de manera muy cuidadosa, la selección de los individuos dentro de la misma zona geográfica para evitar diferencias de composición genética entre el grupo de pacientes y el grupo controles.

La base genética de la enfermedad tromboembólica es compleja, ya que están implicados múltiples genes y factores ambientales con todas sus posibles interacciones (Rosendaal 1999). Este concepto de enfermedad poligénica y multifactorial, hace que sean precisos nuevos métodos de investigación de nuevas causas o mecanismos de trombofilia (Blangero *et al.*, 2003). La trombofilia puede entenderse como la susceptibilidad a sufrir trombosis. Un individuo con factores de riesgo genéticos trombofílicos, a los que se unen unos factores ambientales fijos o variables (edad, cirugía, anticonceptivos orales, etc), desarrolla la enfermedad (trombosis) cuando su susceptibilidad sobrepasa un determinado umbral.

El estudio de las enfermedades complejas ha progresado enormemente en los últimos 10 años, con el desarrollo de nuevas estrategias y metodologías analíticas que hacen posible la localización y la identificación de las diferentes variantes genéticas responsables de la enfermedad. La metodología basada en el análisis de ligamiento genético mediante el análisis de rasgos cuantitativos (fenotipos como la RPCa, niveles de FXII o FVIII) que correlacionan con el riesgo a padecer la enfermedad, representa una de las mejores opciones para poder llegar a identificar los *loci* de rasgo cuantitativo (QTLs) que influyen en la susceptibilidad a la enfermedad (Blangero *et al.*, 2003). Esta metodología requiere el estudio de familias extensas y, hasta el momento, en el campo de la trombofilia son más frecuentes los estudios de asociación caso-control, ya que es más fácil conseguir este tipo de grupos de individuos no emparentados. Sin embargo debido a la facilidad del análisis genético de polimorfismos, en los últimos años ha habido una auténtica avalancha de estudios de asociación caso-control y en algunas ocasiones con resultados contradictorios e incluso sin haber llegado a demostrar el papel fisiológico que puede representar (Lane y Grant, 2000).

Es evidente que para llegar a identificar nuevas anomalías implicadas en la trombofilia, se ha de iniciar el análisis mediante estudios de ligamiento genético en estudios familiares. Una vez se ha identificado una nueva variante genética que correlacione con la enfermedad, se ha de realizar un estudio de asociación caso-control representativo de nuestro entorno para poder cuantificar el riesgo de trombosis que puede llegar producir respecto al resto de factores de riesgo conocidos tanto genéticos como ambientales.

CONCLUSIONES

1. La RPCa es un factor de riesgo tromboembólico independiente de la mutación FVL. Tanto la delección en el dominio B del FV (3997-4104EX13del del *F5*) como los polimorfismos localizados en esta zona del gen, no parecen alterar las propiedades funcionales de la proteína del FV.
 - 2- La variante alélica PT20210A, y no otra en el gen de la protrombina, es un polimorfismo funcional que influye en los niveles plasmáticos de la protrombina y en la susceptibilidad a la trombosis.
 - 3- El riesgo de trombosis venosa, en familias con trombofilia asociadas con algún defecto, muestra una disminución en el siguiente orden: AT > PS > PC > FVL > PT20210A
 - 4- La asociación de la mutación FVL a las deficiencias AT, PC y PS incrementa el riesgo a la trombosis venosa.
 - 5- La asociación de la mutación PT20210A a la deficiencia de AT, PS y a la mutación FVL incrementa el riesgo de trombosis venosa. En el caso de la asociación de la PT20210A a la deficiencia de PC no incrementa el riesgo de trombosis.
 - 6- La homocigosis (T/T) para el polimorfismo C46T del gen *F12*, es un nuevo factor de riesgo de trombosis venosa en la población española. Debido a su relevancia clínica en nuestro entorno, desarrollamos un método rápido, sencillo y reproducible, mediante un termociclador en tiempo real (LightCycler, Roche) para poder llevar a cabo su genotipación.
 - 7- Los resultados de nuestro estudio muestran como los niveles elevados de FVIII y los grupos no-O, probablemente el alelo A_1 , son factores de riesgo independientes para la susceptibilidad a la trombosis venosa en población española.
 - 8- Bajo el punto de vista clínico, el estudio de la recurrencia de TVP observada en la presente tesis muestra como:
 - Los niveles de FVIII superiores al punto de corte de 232% (percentil 90) incrementa hasta dos veces más el riesgo a padecer trombosis recurrentes.
 - Existe una mayor proporción de trombosis recurrentes en pacientes de familias que asocian la deficiencia de PC con las mutaciones FVL o la mutación PT20210A.
-

- Los pacientes de familias que asocian las mutaciones FVL y PT20210A presentan mayor frecuencia de recurrencia.
 - La menor frecuencia de trombosis recurrentes se da en los individuos de familias que sólo asocian la mutación PT20210A.
- 9- Las mujeres portadoras de la mutación FVL o la mutación PT20210A muestran una mayor tendencia a presentar clínica trombótica relacionada con el uso de anticonceptivos orales.
- 10- La combinación del análisis de ligamiento, junto con el estudio de asociación caso-control, proporciona un sistema muy potente para identificar variantes del ADN que contribuyen a la susceptibilidad de la enfermedad tromboembólica.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aiach M, Borgel D, Gausсен P, Emmerich J, Alhenc Gelas M, Gandrille S. Protein C and protein S deficiencies. *Semin Hematol* 1997; 34: 205-216.

Alhenc-Gelas M, Nicaud V, Gandrille S, van Dreden P, Amiral J, Aubry ML, Fiessinger JN, Emmerich J, Aiach M. The factor V gene A4070G mutation and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 81:193-197.

Rezaie A R. Exosite-dependent regulation of the protein C anticoagulant pathway. *Trends Cardiovascular Medicine* 2003; 13: 8-15.

Allaart CF, Aronson Dc, Ruys T, Rosendaal FR, van Bockel JH, Bertina RM, Briet E. Hereditary protein S deficiency in young adults with arterial occlusive disease. *Thromb Haemost.* 1990; 64: 206-210.

Almasy L, Blangero J. Multipoint quantitative trait linkage analysis in general pedigrees. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1198-1211.

Almasy L, MacCluer JW. Association studies of vascular phenotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1055-1057.

Almasy L, Soria JM, Souto JC, Coll I, Bacq D, Faure A, Mateo J, Borrell M, Muñoz X, Sala N, Stone WH, Lathrop M, Fontcuberta J, Blangero J. A quantitative trait locus influencing free plasma protein S levels on human chromosome 1q. Results from the genetic analysis of idiopathic thrombophilia (GAIT) Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 508-511.

Angleton P, Chandler WL, Schmer G. Diurnal variation of tissue-type plasminogen activator and its rapid inhibitor (PAI-1). *Circulation* 1989; 79: 101-106.

Ariëns RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant P. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphism. *Blood*, 2002; 100; 743-754.

Ariëns RAS, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and effects cross-linked fibrin structure. *Blood*. 2000; 96: 988-995.

Astrup T. The haemostatic balance. *Thromb Diath Haemorrh (Stuttg)*.1958; 2: 347-357.

Attíe-Castro FA, Zago MA, Lavinha J, Elion J, Rodriguez-Delfin L, Guerreiro JF, Franco RF. Ethnic heterogeneity of the factor XIII Val34Leu polymorphism. *Thromb Haemost*. 2004; 601-603.

Balleisen L, Bailey J, Epping PH, Schulte H, van de Loo J. Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population. I. Baseline data on the relation to age, gender, body-weight, smoking, alcohol, pill-using and menopause. *Thromb Haemost* 1985a; 54: 475-479.

Balleisen L, Assman G, Bailey, Epping PH, Schulte H, van de Loo J. Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population. II. Baseline data on the relation of blood pressure, blood glucose, uric acid, and lipid fractions. *Thromb Haemost* 1985b; 54: 721-723.

Bauer KA. Management of thrombophilia *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1429-1434.

Baumgartner HR. The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition and formation of mural thrombi. *Microvasc Res* 1973; 5: 167-179.

Bayston TA, Lane DA. Antithrombin: molecular basis of deficiency. *Thromb Haemost* 1997; 78: 339-343.

Bajzar L Thrombin activable fibrinolysis and an antifibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2511-2518.

Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E, Castaman G, Sachi E, Mannucci PM. A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood*, 1997; 90: 1552-1557.

Bertina RM, Koeleman BPC, T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 1994; 369: 64-67.

Bertina RM. Protein C deficiency and venous thrombosis- the search for the second genetic defect. *Thromb Haemost.* 2000; 83: 360-361.

Bertina RM. Genetic approach to thrombophilia. *Thromb Haemost* 2001; 86: 92-103.

Blajchman M, Austin R, Fernández-Rachubinski F, Sheffield W. Molecular basis of inherited antithrombin deficiency. *Blood.* 1992; 80: 2159-2171.

Blangero J, Williams JT, Almasy L. Novel family-based approaches to genetic risk in thrombosis. *J of Thromb Haemost.* 2003;1: 13191-1397.

Bloemenkamp KWM, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Bertina RM, Vanderbroucke JP. Haemostatic effects of oral contraceptives in women who develop deep-vein thrombosis while using oral contraceptives. *Thromb Haemost* 1998; 80: 382-387.

Bock SC, Harris JF, Balazs I, Trent JM. Assignment of the human antithrombin III structural gene to chromosome 1q23-25. *Cytogenet Cell Genet* 1985; 39:67-69.

Bock SC, Marrinan JA, Radziejewska E. Antithrombin III Utah: proline-407 to leucine mutation in a highly conserved region near the inhibitor reactive site. *Biochemistry* 1988; 27: 6171-6178.

Borrell M, Llobet D, Ortín R, Felices R, Vallvé C, Mateo J, Souto JC, Fontcuberta J. Thromboplastin-thrombomodulin-mediated time: a new global test sensitive to protein S deficiency and increased levels of factors II,V,VII and X. *Haematologica* 2002;87:415-419.

Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* .1995; 274: 1049-1057.

Bovill EG, Hasstedt SJ, Leppert MF, Long GL. Hereditary thrombophilia as a model for multigenic disease. *Thromb Haemost.* 1999; 82: 662-666.

Bovill EG, Hasstedt SJ, Callas PW, Valliere JE, Scott BT, Bauer KA, Long GL. The G20210A prothrombin polymorphism is not associated with increased thromboembolic risk in a large protein C deficient kindred. *Thromb Haemost* 2000; 83: 366-370.

Bowen DJ. An influence of ABO group on the rate of proteolysis of von Willebrand factor by ADAMTS13. *J Thromb Haemost.* 2003; 1: 33-40.

Braat EA, Dooijewaard G, Rijken DC. Fibrinolytic of activated FXII. *Eur J Biochem* 1999; 263: 904-911.

Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik and Brudin I. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease. The result of a meta-analysis. *Circulation* 1998; 98; 2250-2556.

Broekmans AW, Conard J. Hereditary protein C deficiency, in: *Protein C and related proteins*. Bertina (eds) Churchill Livingstone, Edinburgh. 1988; Ch 10: 160-181.

Broekmans AW, Bertina RM, Reinalda-Poot J, Engesser L, Muller HP, Leeuw JA, Michiels JJ, Brommer EJ, Briet E. Hereditary protein S deficiency and venous thromboembolism, a study in three Dutch families. *Thromb Haemost* 1985; 53: 273 277.

Brown K, Luddington R, Williamson D, Baker P, Baglin T. Risk of venous thromboembolism associated with a G to A transition at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene. *Br J Haematol* 1997; 98: 907-909.

Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995; 74: 90-93.

Buil A, Soria JM, Souto JC, Almasy L, Lathrop M, Blangero J, Fontcuberta J. Protein C levels are regulated by a quantitative trait locus on chromosome 16: results from the Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia (GAIT) Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24 (7): 1321-1325.

Butenas S, Mann KG. Review: Blood coagulation. *Biochemistry* 2001;67(1): 3-12.

Caen J, Larrieru, Samama M.: L'Hemostase. Methode d'exploration et de diagnostique pratique. L'expansion scientifique Française. Paris, 1975.

Caprini JA, Glase CJ, Anderson CB, Hathaway K. Laboratory markers in the diagnosis of venous thromboembolism. *Circulation* 2004; 109: 4-8.

Ceelig H, Spaargaren-van Riel C, Bertina RM and Vos HL. G20210A is a functional mutation in the prothrombin gene; effect on protein levels and 3'-end formation. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 119-127 .

Chan WP, Lee CK, Kwong YL, Lam CK, Liang R. A novel mutation of factor V in Hong Kong Chinese. *Blood* 1998; 91: 1135-1139.

Chandra T, Stackhouse R, Kidd VJ, Woo SLC. Isolation and sequence characterization of a cDNA clone of human antithrombin III. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1845-1848.

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt

AM, Stern DM. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 1998; 91: 3527-3561.

Clauss A Gerinnungsphysiologische schemellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematologica* 1946; 17: 237-246.

Colan MG, Folsom AR, Finch A. Antithrombin III: associations with age, race, sex and cardiovascular disease risk factors. The atherosclerotic risk in communities (ARIC) study investigators. *Thromb Haemost* 1994; 72: 551-556.

Coller BS, Owen J, Jesty J, Horowitz D, Reitman MJ, Spear J, Yeh T, Comp PC. Deficiency of plasma protein S, protein C, or antithrombin III and arterial thrombosis. *Arteriosclerosis* 1987; 456-462.

Comp PC, Esmon CT. Recurrent thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *New England Journal of Medicine* 1984; 311: 1525-1528.

Comp PC. Laboratory evaluation of protein S status. *Semin Thromb Hemost* 1990; 16: 177-181.

Conard J, Horellou MH, van Dreden P, Lecompte T, Samama M. Thrombosis and pregnancy in congenital deficiencies in AT III, protein C or protein S: study of 78 women. *Thromb Haemost.* 1990 Apr 12; 63(2): 319-20.

Cooper DN, Nussbaum RL, Krawezak M. Proposed guidelines for papers describing DNA polymorphism-disease associations. *Hum Genet* 2002; 110: 207-208.

Corral J, Gonzalez-Conejero R, Rivera J, Ortuño F, Aparicio P, Vicente V. Role of the 807 C/T polymorphism of the alpha2 gene in platelet GP Ia collagen receptor expression and function--effect in thromboembolic diseases. *Thromb Haemost* 1999; 81: 951-956.

Cox DR, Oakes D. Analysis of survival data. London : Chapman and Hall. 1984.

Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognised mechanism characterised by a poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 1004-1008.

Dahlbäck B. Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis, is due to a mutation in the factor V gene. Haemostasis. 1994, 24: 139.

Dahlbäck B. The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis. Thromb Res 1995; 77:1-43.

Dahlbäck B. Blood coagulation. Lancet. 2000; 255: 1627-1632.

De Brujin SF, Stam J, Koopman MM, Vandenbroucke JP. Case-control study of risk of cerebral sinus thrombosis in oral contraceptive users who are carriers of hereditary prothrombotic conditions. BMJ 1998; 316: 589-592.

De Lange M, Snieder H, Ariens RAS, Spector TD, Grant PJ. The genetics of haemostasis: a twin study. Lancet 2001; 357: 101-105.

De Stefano V, Leone G, Mastrangelo S, Tripodi A, Rodeghiero F, Castaman G, Barbui T, Finazzi G, Bizzi B, Mannucci PM. Clinical manifestations and management of inherited thrombophilia: retrospective analysis and follow-up after diagnosis of 238 patients with congenital deficiency of antithrombin III, protein C, protein S. Thromb Haemost. 1994 Sep;72(3):352-358.

De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, Rossi E, Leone G. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and G20210A prothrombin mutation. N Engl J 1999; 341: 801-806.

De Stefano V, Casorelli I, Rossi E, Zappacosta B, Leone G. Interaction between hyperhomocysteinemia and inherited thrombophilia factors in venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 305-311.

De Visser MC, Rosendaal FR, Bertina RM. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. *Blood* 1999. 15; 1271-1276.

De Visser CH, Guash JF, Kamphuisen PW, Vos HL, Rosendaal FR, Bertina RM. The HR2 haplotype of factor V: effects on factor V levels, normalised activated protein C sensitivity ratios and risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2000; 83: 577-582.

Den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Gerrits WBJ, Bos GMJ, Briët E, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 759-762.

Desmarais S, de Moerloose P, Reber G, Minazio P, Perrier A, Bounameaux H. Resistance to activated protein C in a unselected population of patients with pulmonary embolism. *Lancet*. 1996, 347: 1374.

Dhainaut JF, Yan SB, Claessens YE. Protein C/activated protein C pathway: overview of clinical trial results in severe sepsis. *Crit Care Med*. 2004 May;32(5 Suppl):S194-201.

Dolan G, Greaves M, Cooper P, Preston FE. Thrombovascular disease and familial plasminogen deficiency: a report of three kindreds. *Br J Haematol* 1988; 70: 417-421.

Douketis JD, Kearon C, Bares S, Duku FK, Ginsberg JS. Risk of fatal pulmonary embolism in patients with treated venous thromboembolism. *JAMA* 1998; 279: 458-462.

Duggirala R, Williams JT, Williams-Blangero S, Blangero J. A variance component approach to dichotomous trait linkage analysis using a threshold models. *Genet Epidemiol.* 1997; 14: 987-992.

Dyke B. PEDSYS: a pedigree data management system (User's manual). San Antonio, TX: Southwest Foundation for Biomedical Research. Population Laboratory, Department of Genetics, PGL Tech Rep.1995; no.2.

Editorial. Freely associating. *Nature Genet.* 1999; 22 (1): 1-2.

Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965; 13: 516-530.

Ehrenforth S, Ludwin G, Klinke S, Krause M, Scharre I, Gott U. The prothrombin 20210A allele is frequently coinherited in young carriers of the factor V Arg 506 to Gln mutation in venous thrombophilia (letter) *Blood.* 1998;91: 2209-2210.

Endler G, Exner M, Mannhalter C, Meier S, Ruzicka K, Handler S, Panzer S, Wagner O, Quehenberger P. A common C→T polymorphism at nt 46 in the promoter region of coagulation factor FXII is associated with decrease factor XII activity. *Thromb Res* 2001; 101: 255-260.

Esmon CT. The protein C anticoagulant pathway. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 135-145.

Esmon CT. Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Haemost* 1993; 70: 29-35.

Esmon CT. Inflammation and thrombosis. *Thromb Haemost.* 2003; 1(7): 1343-1348.

Exner T, Rickard KA, Kronenberg H. A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patters. *Brit J Haematol.*1978; 49: 143-151.

Falconer DS, Mackay TFC. Introduction to quantitative genetics. Longman Group Ltd. Essex 1996.

Foster D, Davie EW. Characterisation of a cDNA coding for human protein C. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 4766-4770.

Foster DC, Yoshitake S, Davie EW. The nucleotide sequence of the gene for human protein C. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 4673-4677.

Franco RF, Reitsma PH. Gene polymorphisms of the haemostatic system and the risk of arterial thrombotic disease. Human Genet 2001; 109: 369-384.

Frezzato M, Tosetto A, Rodeghiero F. Validated questionnaire for the identification of previous personal or familial venous thromboembolism. Am J Epidemiol 1996; 143, 1257-1265.

Frosst P, Blom HJ, Milos R. A candidate gene risk factor for vascular disease: a common mutation in methylentetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995; 10:111-113.

Gambaro G, Anglani F, D'Angelo A. Association studies of genetic polymorphism and complex disease. Lancet 2000; 355: 308-311.

Gandrille S, Borgel D, Eschwege-Gufflet V. Identification of 15 different candidate casual point mutations and three polymorphisms in 19 patients with protein S deficiency using a scanning method for analysis of the protein S activate gene. Blood 1995; 85: 130-138.

Gandrille S, Borgel D, Ireland H, Lane DA, Simmonds R, Reitsma PH, Mannhalter C, Pabinger I, Saito H, Suzuki K, Formstone C, Cooper DN, Espinosa Y, Sala N, Bernardi F, Aiach M. Protein S deficiency: a database of mutations. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost 1997; 77: 1201-1214.

Gandrille S, Borgel D, Sala N, Espinosa-Parrilla Y, Simmonds R, Rezende S, Lind B, Mannhalter C, Pabinger I, Reitsma PH, Formstone C, Cooper DN, Saito H, Suzuki K, Bernardi F, Aiach M. Protein S deficiency: a database of mutations. *Thromb Haemost* 2000; 84: 918.

Girolami A, Simioni P, Zanardi S, Coser E, Signora S. The genetics of thrombosis. *Haematologica*. 1991 Jun;76 Suppl 3:249-260.

Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA; Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 1-6.

Ginsberg JS, Bates SM. Management of venous thromboembolism during pregnancy. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1435-1442.

Goldhaber SZ. Epidemiology of pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *Haemostasis and Thrombosis* (ed. By A.L. Bloom, CD Forbes, DP Thomas and EGD Tuddenham), Churchill Livingstone, Edinburgh 1994; 1327.

Greengard JS, Fisheer CL, Villoutreix B, Griffin JH. Structural basis for type I and type II deficiencies of antithrombotic plasma protein C: patterns revealed by three-dimensional molecular modelling of mutations of the protease domain. *Proteins* 1994; 18: 367-380.

Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernández JA, Griffin JH, Evatt B. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet* 1994; 343: 1361-1362.

Griffin J H, Evat BL, Zimmerman T S, Kleis AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *Journal of Clinical Investigation*, 1981; 68: 1370-1373.

Griffin JH, Evatt BL, Wideman C, Fernandez JA. Anticoagulant protein C pathway defective in a majority of thrombophilic patients. *Blood*, 1993; 82: 1989-1993.

Hakten M, Deniz U, Ozbag G, Ulutin O. Two cases of homozygous antithrombin III deficiency in a family with congenital deficiency of ATIII. In: Sezinger H, Vinazzer H, eds., Thrombosis and haemorrhagic disorders. Wurzburg: Schmitt und Meyer GmbH, 1989: 177-181.

Hasstedt SJ, Bovill EG, Callas PW, Long GL. An unknown genetic defect increases venous thrombosis risk, through interaction with protein C deficiency. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 569-576.

Having O Deep vein thrombosis and pulmonary embolism: An study with multiple regression analysis of possible risk factors. *Acta Chirurgica Scandinavica (Suppl.)*. 1977; 478: 1-120.

Heit JA, Phelps MA, Ward SA, Slusser JP, Petterson TM, De Andrade M. Familial segregation of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2004; 2(5): 731-736.

Helmerhorst FM, Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Vandenbroucke JP. Oral contraceptives and thrombosis disease; risk of venous thromboembolism disease: risk of venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 1997; 78: 327-333.

Heyboer H, Branjes D, Büller HR, Sturk A and ten Cate JW. Deficiencies of coagulation inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *New England Journal of Medicine* 1990; 323: 1512-1516.

Hille ET, Westendorp RG, Vandrebourcke JP, Rosendaal FR. Mortality and causes of death in families with the factor V Leiden mutation (resistance to activated protein C). *Blood* 1997; 89: 1963-1967.

Hirsh J, Hull RD, Raskob GE. Epidemiology and pathogenesis of venous thrombosis. *Journal of the American College of Cardiology* 1986; 8: 104B-113B.

Hirsh J, Colman WC, Marder VJ, George JN, Clowes AW. Overview of thrombosis and its treatment. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 4^a ed. Philadelphia, PA 19106 USA: Lippincott Williams & Wilkins 2001; 1071-1084.

Holzman NA, Marteau TM. Will genetics revolution in Medicine. N Engl J Med 2000; 343: 141-144.

Hoskins JA, Norman DK, Beckmann RJ, Long GL. Cloning and characterisation of a human liver cDNA encoding a protein S precursor. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 349-353.

Hosmer DW, Lemeshow S. Applied logistic regression. New York: Willey. 1989.

Jandl JH. Thrombotic disorders. In: Blood. Textbook of Haematology. Boston, New York, Toronto, London: Little and Company: 1361-1414.

Jenny RJ, Pittman DD, Toole JJ, Kriz RW, Aldape RA, Hewick RM, Kaufman RJ, Mann KG. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 4846-4850.

Jick H, Slone D, Westerholm B, Inman WH, Vessey MP, Shapiro S, Lewis GP, Worcester J. Venous thromboembolic disease and ABO blood type. Lancet 1969; 1: 539-542.

Johustone A and Thorpe R. Immunochemistry in practice. Blackwell Scientific Publication. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne 1985.

Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. J Biol Chem 1994; 269: 31869-31880.

Kamphuisen PW, Houwing-Duistermaat JJ, van Houwelingen HC, Eikenboom JCJ, Bertina RM, Rosendaal FR. Familial clustering of factor VIII and von Willebrand factor levels. *Thromb Haemost.* 1999; 79:323-327.

Kamphuisen PW, Eikenboom JCJ, Vos HL, Pablo R, Sturk A, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased levels of factor VIII and fibrinogen in patients with venous thrombosis are not caused by acute phase reactions. *Thromb Haemost.* 1999; 81: 680-683.

Kanaji T, Okamura T, Osaki K, Kuroiwa M, Shimoda K, Hamasaki N, Niho Y. A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood* 1998; 91 (5): 2010-2014.

Kane WH, Davie EW. Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6800-6804.

Kane Wh, Devore-Carter D, Ortel TL. Expression and characterization of recombinant human factor V and a mutant lacking a major portion of the connecting region. *Biochem* 1990; 29: 6762-6768.

Kang SS, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Morusis M, Ruggie N. Thermolabile methyltetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991, 48 536-545.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 1958; 53: 547-481.

Kendall MG, Stuart A The advanced theory of statistics. Volume 2, New York, NY: Hafner; 1967.

Kleinbaum DG, Kupper LL, Muller KE. Applied Regression Analysis and other Multivariable Methods (2^a ed.). Boston: PWS-KENT. 1988.

Kleinbaum DG. Logistic regression. A self-learning text. New York: Springer-Verlag. 1994.

Koedam JA, Meijers JCM, Sixma JJ, Bouma BN. Inactivation of human factor VIII by activated protein C, cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. *J Clin Invest* 1988; 82: 1236-1243.

Koeleman B, Reitsma P, Allaart CF, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk factor to thrombosis in protein C-deficient families. *Blood* 1994; 84 (4): 1031-1035.

Koeleman BPC, van Rumpft D, Hamulyak K, Reitsma PH, Bertina RM. Factor V Leiden: an additional risk factor for thrombosis in protein S deficient families *Thromb Haemost* 1995; 74: 580-583.

Koeleman BPC, Reitsma PH, Bakker E, Bertina RM. Location on the human genetic linkage map of 26 genes involved in blood coagulation. *Thromb Haemost* 1997; 77: 873-878.

Koeleman BPC, Reitsma R, Bertina RM. Familial thrombophilia: a complex genetic disorder. *Seminars in Hematology*, 1997; 34: 256-264.

Koppelman SJ, Hackeng TM, Sixma JJ, Bouma BM. Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for specific binding of protein S to Factor VIII. *Blood* 1995; 86: 1062-1071.

Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briët E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden thrombophilia study. *Lancet* 1993; 342: 1503-1506.

Koster T, Blann AD, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in-effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* 1995; 345: 152-155.

Kraaijenhagen RA, in't Anker PS, Koopman MM, Reitsma PH, Prins MH, van den Ende A, Buller HR. High plasma concentration of factor VIII:C is a major risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2000; 83: 5-9.

Kyger EM, Krevolín MD and Powell MJ. Detection of the hereditary hemochromatosis gene mutations by realtime fluorescence polymerase chain reaction and peptide nucleic acid clamping. *Anal Biochem* 1998; 260: 142-148.

Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M, Schneider B, Weltermann A, Speiser W, Lechner K, Eichinger S. High plasma of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2000; 343: 457-462.

Lane DA, Olds RJ, Boisclair M, Chowdhury V, Thein SL, Cooper DN, Blajchman M, Perry D, Emmeich J, Aiach M. Antithrombin III mutation database: first update. *Thromb Haemost* 1993; 70:361-369.

Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA,, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandym Dahlbäck B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited thrombophilia: part 1 & 2. *Thrombosis and Haemostasis*, 1996; 76: 651-662 & 824-834.

Lane DA, Bayston T, Olds RJ, Fitches AC, Cooper DN, Millar DS, Jochmans K, Perry DJ, Okajima K, Thein SL, Emmerich J. Antithrombin mutation database: 2nd (1997) update. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemostas* 1997; 77: 197-211.

Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphism in venous and arterial disease. *Blood*. 2000; 95: 1517-1532.

Laurell. Electroimmunoassay. *Scand. J Clin Lab Invest* 1972; 29: 21-37.

Lensen R, Rosendaal F, Vandenbrucke J, Bertina R. Factor V Leiden: the venous thrombotic risk in thrombophilic families. *Br J Haematol* 2000; 220 (4): 939-945.

Lensing AWA, Prins MH. Recurrent deep vein thrombosis and two coagulation factor gene mutations quo vadis?. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1564-1566.

Levi M, Hack CE, de Boer JP, Brandjes DP, Buller HR, ten Cate JW. Reduction of contact activation related fibrinolytic activity in factor XII deficient patients. Further evidence for the role of the contact system in fibrinolysis in vivo. *J Clin Invest* 1991; 88: 1155-1160.

Lijnen HR, Collen D. Interaction of plasminogen activators and inhibitors with plasminogen and fibrin. *Semin Thromb Haemost* 1982; 8; 2-10.

Lintel Hekkert W, Bertina RM, Reitsma PH. Two RFPLS approximately 7 kb 5' of the human protein C gene. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:11849.

Lowe GD, Rumley A, Woodward M, Morrison CE, Philippou H, Lane DA, Tunstall-Pedoe H. Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: the Third Glasgow MONICA Survey. I. Illustrative reference ranges by age, sex, and hormone use. *Br J Haematol* 1997; 97: 775-784.

Lunghi B, Iacoviello L, Gemmati D, Dilasio MG, Castoldi E, Pinotti M, Castaman G, Redaelli R, Mariani G, Marchetti G, Bernardi F. Detection of new polymorphic markers in the factor V gene: association with factor V levels in plasma. *Thromb Haemost* 1996; 75: 45-48.

Macfarlane R. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964; 202: 498-499.

Mackman N. Role of tissue factor in haemostasis, thrombosis and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:1-9.

Mahasandana C, Suvattte V, Marlar RA, Amnco Johson MJ, Jacobson LJ, Hathaway WE. Neonatal purpura fulminans associated with homozygous protein S deficiency. *Lancet* 1990; 355: 61-62.

Makris M, Preston FE, Beauchamp NJ, Cooper PC, Daly M, Hampton KK, Bayliss P, Peake IR, Miller GJ. Co-inherited of the 20210A allele of the prothrombin gene increases the risk of thrombosis in subjects with familial thrombophilia. *Thromb Haemost.*1997; 78: 1426-1429.

Makris M. Hyperhomocysteinemia and thrombosis. *Clin Lab Haem.* 2000; 22:133-143.

Malm J, Laurell M, Nilsson IM and Dahlbäck B. Thromboembolic disease-critical evaluation of laboratory investigation. *Thromb and Haemost,* 1992; 68: 7-13.

Mannucci PM, Tripodi A, Bertina RM. Protein S deficiency associated with “juvenile” arterial and venous thromboses. *Thromb Haemost* 1986; 55: 440.

Mannucci PM, Tripodi A, Bottasso B, Baudo F, Finazzi G, De Stefano V, Palareti G, Manotti C, Mazzucconi MG, Castaman G. Markers of procoagulant imbalance in patients with inherited thrombophilic syndromes. *Thromb Haesmot* 1992; 67: 200-202.

Mannucci R, Abbate R, and Fedi S. Acquired activated protein C resistance in postmenopausal women is dependent on factor VIII:C levels. *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 769-772.

Mansvelt EPG, Laffan M, McVey JH, Tuddenham EGD. Analysis of the F8 gene in individuals with high plasma factor VIII: C levels and associated venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1998; 80: 561-565.

Marlar RA, Montgomery RR, Broekmans AW. Diagnosis and treatment of homozygous protein C deficiency. Report of the Working Party on Homozygous Protein C Deficiency of the Subcommittee on Protein C and Protein S, International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *J Pediatr*. 1989 Apr;114(4 Pt 1):528-534

Martinelli I, Landi G, Merati G, Cella R, Tosetta A, Mannucci PM. Factor V gene mutation is a risk factor for cerebral venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1996; 75: 233.

Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, Taioli E, Rossi V, Crosti F, Paciaroni K, Leone G, Faioni EM. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood* 1998a; 92: 2353-2358.

Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taiolo E, Duca F, Mannucci PM. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and users of oral contraceptives. *N Engl J Med* 1998b; 338: 1793.

Martinelli I, Taioli E, Bucciarelli P, Akhavan S, and Mannucci PM. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 700-703.

Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J and the EMET Group. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism. Results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET- Study). *Thromb Haemost* 1997; 77: 444-451.

Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J, and the EMET Group. Increased risk venous thrombosis in carriers of natural anticoagulant deficiencies. Results of the

family studies of the Spanish Multicenter Study on Thrombophilia (EMET Study). *Blood Coag Fibrinol*. 1998; 9:71-78.

Meade TW, Cooper JA, Stirling Y, Howarth DJ, Ruddock V, Miller GJ. Factor VIII, ABO blood group and the incidence of ischemic heart disease. *Br J Haematol* 1994; 88:601-607.

Medalie JH, Levene C, Papier Ch, Goldbourt U, Dreyfuss F, Oron D, Neufeld H, Riss E. Blood groups, myocardial infarction and angina pectoris among 10.000 adult males. *N Engl J Med* 1971; 285: 1348-1353.

Meijers HCN, Winne Le, Tekelenburg MSC. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med* 2000; 342: 696.

Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*. 2003; 196: 430-443.

Middeldrop S, Henkens C, Koopman MM. The incidence of venous thromboembolism in family members of patients with factor V Leiden mutation and venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1998; 128: 15-20.

Miletich J, Sherman L, Broze G. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 1987; 317: 991-996.

Miletich JP, Prescott SM, White R, Majereus PW, Bovill EG. Inherited predisposition to thrombosis. *Cell* 1993; 72: 477-480.

Miller SA, Dyckes AA, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res*. 1988; 16, 1215.

Minnena MC, Peters RJ, de Winter R, Lubbers YP, Barzegar S, Bauer KA, Rosenberg RD, Hack CE, ten Cate H. Activation of clotting factors XI and IX in patients with acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2489-2493.

Mudd SH, Levy HL, Skovby B. Disorders of trans-sulfuration. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Scriver CT, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds), 7th ed. Mc Graw-Hill, New York 1995: 1279-1327.

Nachman RL, Silverstein R. Hypercoagulable states. *Ann of Intern Med*, 1993; 119: 819-827.

Nordstrom M, Lindblad B, Bergqvist D, Kjellstrom T. A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. *J Int Med* 1992; 232: 155-160.

O'Connell NM. Factor XI deficiency. *Semin Hematol*. 2004; 41: 76-81.

O'Donell J, Tuddenham EGD, Manning R, Kemball-Cook G, Johson D, Laffan M. High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia screening: role of increased synthesis and relationship to the acute phase reaction. *Thromb Haemost*. 1997; 77: 825-828.

O'Donell J, Munford AD, Manning RA, Laffan M. Elevation of FVIII:C in venous thromboembolism is persistent and independent of acute phase response. *Thromb Haemost* 2000; 83: 10-13.

O'Donell J, Boulton FE, Manning RA, Laffan MA. Amount of H antigen expressed on circulating von Willebrand factor is modified by ABO blood group genotype and is a major determinant of plasma von Willebrand factor antigen levels. *Arterioscler Throm Vas Biol* 2002; 22: 335-341.

Odegard OR, Lie M, Abildgaard U. Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method. *Thromb Res* 1975; 6: 287-294.

Olds RJ, Lane DA, Chowdhury V, Sas G, Pabinger I, Auburger K, Thein SL. (ATT) trinucleotide repeats in the antithrombin gene and their use in determining the origin of repeated mutations. *Hum Mut* 1994a; 4: 31-41.

Olds RJ, Lane DA, Mille B, Chowdhury V, Thein SL. Antithrombin: the principal inhibitor of thrombin. *Sem Thromb Haemostas* 1994b; 20: 353-372.

Olson ML, Chester MA. A rapid and simple ABO genotype screening method is using a novel B/O2 versus A/O2 discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. *Vox Sang.* 1995; 69: 242-247.

Orstavik KH, Magnus P, Reisner H, Berg K, Graham JB, Nance W. Factor VIII and factor IX in a twin population. Evidence for a major effect of ABO locus on factor VIII level. *Am J Hum Genet.* 1985; 37: 89-101.

Pabinger I, Schneider B. Thrombotic risk in hereditary antithrombin III, protein C, or protein S deficiency. A cooperative, retrospective study. Gesellschaft fuer Thrombose-und Hamostaseforschung (GTH) Study Group on Natural Inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 742-748.

Prandoni P, Lensing AW, Cogo A, Cuppini S, Villalta S, Carta M, Cattelan AM, Polistena P, Bernardi E, Prins MH. The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1996;125 :1-7.

Patracchini P, Aiello V, Palazzi P, Calzolari E, Bernardi F. Sublocalization of the human protein C gene on chromosome 2q13-q14. *Human Genet* 1989; 81:191-192.

Plow EF, Collen D. The presence and release of alpha 2-antiplasmin from human platelets. *Blood* 1981; 58: 1069-1074.

Plutzky J, Hoskins JA, Long GL, Crabtree GR. Evolution and organization of the human protein C gene. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1986; 83 : 546-550.

Pools van Amstel HK, Reitsma PH, van der Logt CP, Bertina RM. Intron-exon organization of the active human protein S gene PS alpha and its pseudogene PS beta: duplication and silencing during primate evolution. *Biochemistry* 1990; 29: 7853-7861.

Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-3703.

Preissner KT. Biochemistry and physiology of blood coagulation and fibrinolysis. *Hamostaseologie*. 2004; 24 (2): 84-93.

Rao DC, Province DC. In genetic dissection of complex traits. Academic Press 2001.

Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346: 133-1134.

Reitsma PH, Bernardi F, Doig R, Gandrille S, Greengard JS, Ireland H, Krawezak M, Lind B, Long GL, Poort SR, Saito H, Sala N, Witt I, Cooper D. Protein C deficiency: A database of mutations, 1995 update. *Thromb Haemost* 1995; 73: 876-889.

Ripoll L, Paulin D, Thomas S, Drouest LO. Multiplex PCR-mediated site-directed mutagenesis for one-step determination of factor V Leiden and G20210A transition of the prothrombin gene. *Thromb Haemost*. 1997; 78:960.

Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85: 1504-1508.

Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombosis: prevalence, risk and interaction. *Semin Hematol* 1997a; 34: 171-187.

Rosendaal FR. Thrombosis in the young epidemiology and risk factors a focus on venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997b; 78 :1-6.

Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH. Geographic distribution of the prothrombin 20210G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 706.

Rosendaal FR Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353:1167-1173.

Rosendaal FR. High levels of factor VIII and venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2000; 83: 1-2.

Rosing J, Tans G. Coagulation factor V: and old star shines again. *Thromb Haemost.* 1997b; 78: 427-433.

Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003;1: 1335-1342.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.

Sanger f, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.

Santamaría A, Mateo J, Oliver A, Menéndez B, Souto JC, Borrell M, Soria JM, Tirado I, Fontcuberta J. Risk of thrombosis associated with oral contraceptives in women from 97 families with inherited thrombophilia: high risk of thrombosis in carriers of the G20210A mutation of the prothrombin gene. *Haematologica* 2001; 86: 965-971.

Schambeck CM, Hinney K, Haubitz I, Mansouri Taleghani B, Whaler D, Keller F. Familial clustering of high factor VIII levels in patients with venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 289-292.

Schwartz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 1984 64: 1297-1300.

Self SG, Liang K-Y. Asymptotic properties of maximum likelihood estimators and likelihood ratio test under non standard conditions. *J Am Stat Assc.* 1987; 82:605.

Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 1984; 64: 1297-1300.

Sidelmann JJ, Gram J, Jespersen J, Kluft C. Fibrin clot formation and lysis: Basic mechanisms. *Sem Thromb Haemost.* 2000; 26: 605-618.

Simioni P, Prandoni P, Burlina A, Tormene D, Sadella C, Ferrari V, Benedetti L, Girolami A. Hyperhomocysteinemia and deep-vein thrombosis: a case-control study. *Thromb Haemost* 1996; 76: 883-886.

Simioni P. The molecular genetics of familial venous thrombosis. *Baillière's Clinical Haematology* 1999; 12: 479-503.

Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Buil A, Faure A, Martínez-Marchán E, Mateo J, Borrell M, Stone W, Lathrop M, Fontcuberta J, Blangero J. A quantitative trait locus in the human FXII gene influences both plasma factor FXII gene influences both plasma factor FXII levels and susceptibility to thrombotic disease. *AM J Hum Genet* 2002; 70: 567-574.

Soria JM, Almasy L, Souto JC, Buil A, Martínez-Marchán E, Mateo J, Borrell M, Stone W H, Lathrop M, Fontcuberta J, Blangero J. A new locus on chromosome 18 that influences normal variation in activated protein C resistance phenotype and factor VIII activity and its relation to thrombosis susceptibility. *Blood*. 2003; 101: 163-167.

Souto JC, Coll I, Llobet D, del Río E, Oliver A, Mateo J, Borrell M, Fontcuberta. The Prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thromb Haemost* 1998; 80: 366-369.

Souto JC, Mateo J, Soria JM, Llobet D, Coll I, Borrell M, Fontcuberta J. Homozygotes for prothrombin gene 20210A allele in a thrombophilic family without clinical manifestations of venous thromboembolism. A review of the literature. *Haematologica*. 1999; 84: 627-632.

Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, JM, Coll I, Felices R, Stone W, Fontcuberta J, Blangero J. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT Study. *Am J Hum Genet* 6. 2000a; 7:1452-1459.

Souto JC, Almasy L, Borrell M, Garí M, Martínez E, Mateo J, Stone W, Blangero J, Fontcuberta J. Genetics determinants of hemostasis phenotypes in Spanish Families. *Circulation* 2000b; 101: 1546-1551.

Souto JC, Almasy L, Muñiz-Díaz E, Soria JM, Borrell M, Bayén L, Mateo J, Madoz P, Stone W, Blangero J, Fontcuberta J. Functional effects of the ABO locus polymorphism on plasma levels of von Willebrand factor, factor VIII and activated partial thromboplastin time. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000c; 20: 2024-2028.

Spronk H MH, Govers-Riemslang JWP, ten Cate H. The blood coagulation system as a molecular machine *BioEssays*. 2003; 25: 1220-1228.

Stockner K. Protein C activators in snake venom. *Behring Inst Mitt* 1986; 79: 37-47.

Svensson PJ, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *New England Journal of Medicine*, 1994; 330: 517-521.

Tait RC, Walker ID, PerryDJ, Islam Si, Dlay ME, Mc Call F, Conkie JA, CarrellRW. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. *Br J Haematol* 1994;87: 106-112.

Tait RC, Walker ID, Reistma PH, Islam SI, McCall F, Poort SR, Conkie JA, Bertina RM. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* 1995;73: 87-93.

Tosetto A, Castaman G, Cappellari A, Rodeguiero F. The VITA project: heritability of resistance to activated protein C. *Thromb Haemost* 2000; 84: 811-814.

van Boven HH, Reitsma PH, Rosendaal FR, Bayston TA, Clowdhury V, Bauer KA, Scharrer I, Conard J, Lane DA. Factor V Leiden (FVR506Q) in families with inherited antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* 1996, 75: 417-421.

van Boven HH, Lane D. Antithrombin and its inherited deficiency states. *Semin Hematol* 1997; 34: 188-204.

Van Hylckama Vlieg A, van der Linden UK, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 2000; 95: 3678-3682.

Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet*. 1994; 344: 1453.

Vicente V, Rodríguez C, Soto I, Fernández M, Moraleda JM. Risk of thrombosis during pregnancy and post-partum in hereditary thrombophilia. *Am J Hematol*. 1994 Jun;46(2):151-152.

Virchow R, Cellular pathology, London, Churchill. 1860.

Voorberg J, Roelse J, Koopman R, Büller H, Berrends F, ten Cate JW, Mertens K, van Mourik JA. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506 of factor V. *Lancet* 1994; 343: 1535-1536.

Walker FJ. Regulation of activated protein C by a new protein S. *J Biol Chem* 1981; 256: 11128.

Watkins PC, Eddy R, Fukushima Y, Byers MG, Cohen EH, Dackowski WR, Wydro RM, Shows TB. The gene for protein S maps near the centromere of human chromosome 3. *Blood* 1988; 71: 238-241.

Wautrecht JC, Galle C, Motte S, Dereume JP, Dramaix M. The role of ABO blood groups in the incidence of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost*. 1998; 79: 668-669.

Weiss KM. Genetic variation and human disease. Cambridge, England: Cambridge University Press; 1993.

Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg³⁰⁶Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood* 1998; 91: 1140-1144.

Wolf M, Boyer-Neumann C, Martinoli J L, Amiral J, Meyer D, Larrieu M J, A new functional assay for human protein S using activated factor V as substrate. *Thromb. Haemostasis* 1989; 62: 1144-1145.

Zivelin A, Griffin JH, Xu X, Pabinger I, Samana M, Conard J, Brenner B, Eldor A, Sligsohn U. A single genetic origin for a common Caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood*, 1997; 89: 397-402.

Zöller B, Berntsdotter A, de Frutos PG, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as an additional risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood*. 1995a; 85: 3518-3523.

Zöller B, Garcia de Frutos P, Dahlbäck B. Evaluation of the relationship between protein S and C4b-binding protein isoforms in hereditary protein S deficiency demonstrating type I and type III deficiencies to be phenotypic variants of the same genetic disease. *Blood* 1995b; 85: 3524-3531.

Zöller B, Svensson PJ, Dahlbäck B, Hillarp A. The A20210 allele of the prothrombin gene is frequently associated with the factor V Arg 506 to Gln mutation but not with protein S deficiency in thrombophilic families (letter) *Blood*. 1998; 91:2210-2211.

Zöller B, García de Frutos P, Hillarp A, Dahlbäck B. Thrombophilia as a multigenic disease. *Haematologica* 1999; 84: 59-70.