



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Plaquetas y enfermedad tromboembólica.

Aspectos genéticos, biológicos y clínicos

Miguel Vázquez Santiago

TESIS DOCTORAL 2017

Unitat d'Hemòstasia i Trombosi

Unitat de Genòmica de Malalties Complexes

Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB-Sant Pau)

Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)



Plaquetas y enfermedad tromboembólica. Aspectos genéticos, biológicos y clínicos

Memoria realizada por *Miguel Vázquez-Santiago* para optar al título de Doctor por la Universidad Autònoma de Barcelona (UAB)

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Núria Pujol Moix, profesora emérita del Departament de Medicina de la UAB, y el Dr. Juan Carlos Souto Andres Cap Clínic de la Unitatd'Hemostàsia i Trombosi del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Tesis adscrita a la Facultat de Biociències de la UAB dentro del programa de Doctorado en Biologia Cel · lular

Miguel
Vázquez Santiago

Dra. Núria
Pujol Moix

Dr. Juan Carlos
Souto Andrés

Bellaterra, Julio del 2017

Saepenumero mirari folco, quomodo fiat,
ut quum fefe prae ceteris diligit
unusquisque, fuam tamen de fe opinionem
minoris faciat, quam aliorum.

Muchas veces me admiré que cada uno se
ame a sí mismo más que a todos, pero
coloque su propia suposición en una
consideración menor que la ajena.

Ad seipsum libri XII, 4, *Marcus Aurelius*

Agradecimientos

Resúmenes

Resum

El paper central de la plaqueta en la trombosi arterial és àmpliament conegut. En els últims anys, s'ha descrit i analitzat extensament la seva participació en l'inici i el desenvolupament de la malaltia tromboembòlica venosa (VTE).

El principal objectiu d'aquesta tesi ha estat la caracterització dels paràmetres plaquetaris en la població sana, així com la estimació de la seva determinació genètica o heredabilitat (h^2). A més s'han descrit l'associació de diversos paràmetres plaquetaris amb el risc de VTE.

Per a això s'han utilitzat dos tipus de mostra: el projecte *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia 2* (GAIT 2), un estudi de 35 famílies, i el projecte denominat *Riesgo de Enfermedad TRomboembòlica VENosa* (RETROVE), un estudi prospectiu cas-control d'individus no emparentats.

L'Estudi #1 ha permès establir uns intervals de normalitat dels recomptes i índexs plaquetaris, fracció plaquetària immadura (IPF) i funció plaquetària global (PFA) representatius de la població espanyola sana dins de la mostra GAIT 2. L'anàlisi de cadascun dels models de regressió lineal mixtos ha permès concloure que existeixen variacions de recomptes i volums plaquetaris entre la població infantil (2–12 anys) i la resta de grups de edat (13–93 anys). Alhora, la funció plaquetària es manté constant al llarg de la vida en part gràcies a la relació inversa existent entre el recompte de plaquetes i el volum plaquetari mitjà. Paral·lelament, s'observa la invariabilitat dels paràmetres de PFA durant la major part de la vida. Els paràmetres de volum i d'IPF es comporten de forma similar respecte a l'edat (augmenten) i el sexe (no varien).

L'Estudi #2 s'ha realitzat en l'àmbit del projecte GAIT 2. Aquest estudi familiar té com a objectiu principal la identificació de gens que determinen la variabilitat dels paràmetres relacionats amb el risc de

VTE. El projecte GAIT 2 ha replicat l'h² de la trombosi venosa descrita en el projecte GAIT 1. A més s'ha determinat les h² dels recomptes i índexs plaquetaris, d'IPF i dels paràmetres de PFA.

Els Estudis #3 i #4 s'han realitzat dins del marc del projecte RETROVE. L'Estudi #3 ha identificat l'associació entre el risc de VTE i diversos paràmetres plaquetaris mitjançant models de regressió lineals generalitzats. En aquest sentit, s'ha descrit l'associació entre el risc de VTE i els recomptes elevats de plaquetes i plaquetòcrit en les dones. A l'Estudi #4, l'augment de la funció plaquetària analitzada per agregometria en sang total (MultiplateTM) no s'ha associat a risc de trombosi. En canvi, la funció plaquetària analitzada mitjançant l'analitzador PFA-100[®] sí que ha estat capaç de detectar el risc, la qual cosa indica que és un mètode altament útil en l'avaluació del risc de VTE.

Resumen

El papel central de la plaqueta en la trombosis arterial es ampliamente conocido. En los últimos años, se ha descrito y analizado ampliamente su participación en el inicio y desarrollo de la enfermedad tromboembólica venosa (VTE).

El principal objetivo de esta tesis ha sido la caracterización de los parámetros plaquetarios en población sana, así como la estimación de su determinación genética o heredabilidad (h^2). Además se han descrito la asociación con el riesgo de VTE de varios parámetros plaquetarios.

Para ello se han utilizado dos tipos de muestra: el proyecto *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia 2* (GAIT 2), un estudio de 35 familias, y el proyecto denominado Riesgo de Enfermedad TROMboembólica Venosa (RETROVE), un estudio prospectivo caso-control de individuos no emparentados.

El Estudio #1 ha permitido establecer unos intervalos de normalidad de los recuentos e índices plaquetarios, fracción plaquetaria inmadura (IPF) y función plaquetaria global (PFA) representativos de la población española sana del proyecto GAIT 2. El análisis de cada uno de los modelos de regresión lineal mixtos ha permitido concluir que existen variaciones de recuentos y volúmenes plaquetarios entre la población infantil (2–12 años) y el resto de grupos de edad (13–93 años). La función plaquetaria se mantiene constante a lo largo de la vida en parte gracias a la relación inversa existente entre el recuento de plaquetas y el volumen plaquetario medio. Paralelamente, se observa la invariabilidad de los parámetros de PFA durante la mayor parte de la vida. Los parámetros de volumen y de IPF se comportan de forma similar respecto a la edad (aumentan) y el sexo (no varían).

El Estudio #2 se ha realizado dentro del ámbito del proyecto GAIT 2. Este estudio familiar tiene como objetivo principal la identificación de genes que determinan la variabilidad de los parámetros relacionados con el riesgo de VTE. El proyecto GAIT 2 ha replicado la h^2 de la trombosis venosa descrita en el proyecto GAIT 1. Además se ha determinado las h^2 de los recuentos e índices plaquetarios, d'IPF y de los parámetros de PFA.

Los Estudios #3 y #4 se han realizado dentro del marco del proyecto RETROVE. El Estudio #3 ha identificado la asociación entre el riesgo de VTE y diversos parámetros plaquetarios mediante modelos de regresión lineales generalizados. En este sentido, se ha descrito la asociación entre el riesgo de VTE y los recuentos elevados de plaquetas y plaquetocrito en las mujeres. En el Estudio#4, el aumento de función plaquetaria analizada por agregometría en sangre total (Multiplate™) no se ha asociado a riesgo de trombosis. En cambio, la función plaquetaria analizada mediante el analizador PFA-100® sí ha sido capaz de detectar el riesgo, lo cual indica que es un método altamente útil en la evaluación del riesgo de VTE.

Summary

The central role of the platelet in the arterial thrombosis is largely known. In the recent years, the platelet involvement in the initiation and development of venous thromboembolism (VTE) has been described and widely discussed.

The main objective of this thesis has been the characterization of the platelet parameters in healthy population, as well as the estimation of their genetic determination or heritability (h^2). In addition, the association of various platelet parameters with the risk of VTE have been described.

We have used two types of sample: the *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia 2* (2 GAIT) project, a study of 35 families, and the project called *Riesgo de Enfermedad TRomboembólica VEEnosa* (RETROVE), a prospective case-control of unrelated individuals.

The Study #1 has established the normal ranges for the platelet counts and indices, immature platelet fraction (IPF) and platelet function (PFA), representative of the healthy Spanish population healthy, part of the GAIT 2 project. The linear mixed models have led to the conclusion that there are variations in platelet counts and volumes between children (2–12 years) and the other groups of age (years 13–93). The platelet function remains constant throughout the life due in part to the inverse relationship between platelet count and the mean platelet volume. Moreover, the PFA parameters did not vary during the life. The parameters of volume and IPF shown similar behaviour with respect to age (increase) and gender (do not vary).

The framework of the Study #2 is the GAIT 2 project. The main objective of this family-based study is the identification of genes that determine the variability of the parameters related to the VTE risk. The GAIT 2 project has replicated the h^2 of the venous thrombosis

already described in GAIT 1 project. Also, we determined the h^2 platelet counts, and indices, IPF and PFA.

The framework of the Studies #3 and #4 are the RETROVE project. The Study #3 has identified the association between the risk of VTE and various platelet parameters using generalized linear regression models. In this regard, the association between risk of VTE and higher counts of platelet and plateletcrit in women has been described. In the Study #4, the increase in the platelet function analysed by aggregometry in whole blood (MultiplateTM) has been not associated with the risk of thrombosis. On the other hand, the platelet function evaluated by the PFA-100[®] analyser whether has been able to detect of the VTE risk, thereby that it is a highly useful method to evaluate of the risk of VTE.

Índice

Agradecimientos

Resúmenes	i
Índice	ix
Listado de tablas	xiii
Listado de figuras	xv
Glosario de abreviaturas	xvii
Prefacio	xxi

Capítulo 1: Introducción	1
1. Antecedentes históricos	3
2. Ultraestructura de la plaqueta	6
3. Plaqueta y hemostasia	10
3.1. Formación del trombo plaquetario	10
3.2. Plaqueta y coagulación	15
4. Población plaquetaria circulante	18
5. Plaqueta y trombosis	22
5.1. Plaqueta y fisiopatología de la trombosis	22
5.1.1. Trombosis arterial	22
5.1.2. Trombosis venosa	23
5.2. Factores adquiridos de riesgo trombótico	24
5.3. Determinantes genéticos de las plaquetas y riesgo de trombosis venosa	27
6. Proyectos de investigación en trombosis venosa	30

6.1. Proyecto GAIT 2	30
6.2. Proyecto RETROVE	32
7. Metodología de laboratorio	33
7.1. Determinación de los recuentos e índices de plaquetas y de la fracción inmadura de plaquetas	33
7.2. Determinación de la función plaquetaria global	36
7.3. Determinación de la agregación plaquetaria	37
8. Metodología estadística	39
8.1. Análisis de regresión	39
8.1.1. Modelos lineales mixtos	40
8.1.2. Modelos lineales generalizados	41
8.2. Entorno R	42
Capítulo 2: Hipótesis y objetivos	43
1. Hipótesis	45
2. Objetivos	47
Capítulo 3: Estudio aportados	49
1. Estudio #1: Age and Gender Effects on 15 Platelet Phenotypes in a Spanish Population.	55
2. Estudio #2: Genetic determinants of Platelet Large-Cell Ratio, Immature Platelet Fraction, and other platelet-related phenotypes.	71

3. Estudio #3: Platelet Count and Plateletcrit are Associated with an Increased Risk of Venous Thrombosis in Females. Results from the RETROVE Study.	83
4. Estudio #4: Short Closure Time Values in PFA-100® are Related with Venous Thrombotic Risk. Results from the RETROVE Study	99
Capítulo 4: Discusión	125
Capítulo 5: Conclusiones	131
Bibliografía	139

Listado de tablas

1.1	Principales receptores presentes en la membrana plaquetaria.	12
1.2	Principales factores de riesgo de trombosis.	25
1.3	Tabla resumen del riesgo de tromboembólico venoso (VTE) asociado a recuento y volumen plaquetarios.	26
1.4	Tabla resumen de heredabilidades (h^2) obtenidas en parámetros plaquetarios.	28
1.5	Descriptiva del proyecto GAIT 2.	31
1.6	Descriptiva del proyecto RETROVE.	32
1.7a	Parámetros plaquetarios (I) evaluados en los diferentes estudios expuestos en el trabajo.	35
1.7b	Parámetros plaquetarios (II) evaluados en los diferentes estudios expuestos en el trabajo.	38
4.1	Modelos utilizados en el cálculo de riesgo de enfermedad tromboembólica venosa (VTE) para los diferentes parámetros plaquetarios analizados en el proyecto RETROVE	129

Listado de figuras

1.1	Fotografía del médico e investigador italiano Giulio Bizzozero en compañía de otros investigadores.	4
1.2	Representación esquemática de un corte ecuatorial de la plaqueta en la que se observan la mayoría de sus estructuras y orgánulos.	6
1.3	Estructuras y orgánulos plaquetarios procedentes de una muestra sanguínea sin anticoagulantes.	9
1.4	Representación esquemática de las funciones plaquetarias dentro de la hemostasia.	11
1.5	Mecanismo de <i>spreading</i> , adhesión y agregación plaquetaria en la formación del trombo.	14
1.6	Representación esquemática de la vías intrínseca y extrínseca dentro de la cascada de la coagulación	17
1.7	Representación esquemática de la formación de proplaquetas y liberación de plaquetas por parte del megacariocito (trombocitopoyesis).	19
1.8	Mecanismos de trombogenesis causantes de trombosis venosa profunda.	24
1.9	Distribución log-normal de la población de plaquetas.	34
3.1	Recuentos plaquetarios, según grupos de edad y sexo, obtenidos por el canal de (a) impedancia (PLT) y (b) óptico (PLTOP) del analizador hematológico Sysmex XE-2100®, en el proyecto GAIT 2..	65
3.2	Parámetros de volumen plaquetario, según grupos de edad, obtenidos por el analizador hematológico Sysmex XE-2100®, en el proyecto GAIT 2.	66

3.3	Parámetros plaquetarios de inmadurez, según grupos de edad, obtenidos por el canal óptico del analizador hematológico Sysmex XE-2100®, en el proyecto GAIT 2.	67
3.4	Heredabilidades (h^2) estimadas para los parámetros plaquetarios analizados en proyecto GAIT 2.	79
3.5	Riesgo tromboembólico venoso (VTE) asociado a 6 parámetros plaquetarios según el Modelo 2 en la muestra RETROVE.	96
3.6	Riesgo tromboembólico venoso (VTE) para el PFAadp según el Modelo 1.	121
3.7	Riesgo tromboembólico venoso (VTE) para el PFAepi según el Modelo 1.	122
3.8	Riesgo tromboembólico venoso (VTE) asociado a los parámetros de PFA y Multiplate™ según el Modelo 4 en la muestra RETROVE.	123

Glosario de abreviaturas

CI	<i>Confidence interval</i>	Intervalo de confianza
CT	<i>Closure time</i>	Tiempo de obturación
GLM	<i>Generalized linear model</i>	Modelo lineal generalizado
GP	<i>Platelet glycoprotein</i>	Glicoproteínas plaquetarias
h^2	<i>Heredability</i>	Heredabilidad / determinación genética
HIPF%	<i>Immature platelet fraction with high RNA content (%)</i>	Fracción inmadura de plaquetas con elevado contenido en RNA
HR	<i>Hazard ratio</i>	Cociente de riesgo
IPF	<i>Immature platelet fraction</i>	Fracción inmadura de plaquetas
IPF%	<i>Immature platelet fraction (%)</i>	Fracción inmadura de plaquetas (%)
IPF-X	<i>Mean RNA content per platelet</i>	Contenido medio de RNA por plaqueta
IPF#	<i>Immature platelet fraction (absolute count)</i>	Recuento absoluto de fracción inmadura de plaquetas
LMM	<i>Linear mixed model</i>	Modelo lineal mixto

MP	<i>Microparticle</i> Micropartícula
MPV	<i>Mean platelet volume</i> Volumen plaquetario medio
MPV40	<i>Mean platelet volume (upper platelet volume threshold at 40fL)</i> Volumen plaquetario medio (umbral superior en 40fL)
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i> Trampas extracelulares de neutrófilos
OR	<i>Odds ratio</i> Razón de momios
PCT	<i>Plateletcrit</i> Plaquetocrito
PCT40	<i>Plateletcrit (upper platelet volume threshold at 40fL)</i> Plaquetocrito (umbral superior en 40fL)
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDW	<i>Platelet width distribution</i> Amplitud de distribución de volúmenes plaquetarios
PFA-100	<i>Platelet function assay 100 (overall platelet function in vitro)</i> Ensayo de función plaquetaria global <i>in vitro</i>
PFAadp	<i>Cartridge of Collagen-ADP for the PFA-100</i> Cartucho de colágeno-ADP para el PFA-100
PFAepi	<i>Cartridge of Collagen-epinephrine for the PFA-100</i> Cartucho de colágeno-epienfrina para el PFA-100

P-LCR	<i>Platelet-large ratio cell</i>	Porcentaje de plaquetas superior a 12 fL
PLT	<i>Standard platelet count</i>	Recuento de plaquetas estándar por impedancia
PLTOP	<i>Optical platelet count</i>	Recuento de plaquetas en el canal óptico del autoanalizador hematológico
PLT40	<i>Platelet count (upper platelet volume threshold at 40fL)</i>	Recuento de plaquetas (umbral superior en 40fL)
RP	<i>Reticulated platelets</i>	Plaquetas reticuladas
TF	<i>Tissue factor</i>	Factor tisular
TxA ₂	<i>Tromboxane A₂</i>	Tromboxano A ₂
vWF	<i>von Willebrand factor</i>	Factor vonWillebrand
VTE	<i>Venous thromboembolism</i>	Enfermedad tromboembólica venosa

Prefacio

El papel central de la plaqueta en la trombosis arterial es ampliamente conocido. Asimismo, en los últimos años, se ha descrito y analizado ampliamente su participación en el inicio y desarrollo de la enfermedad tromboembólica venosa (VTE). El reconocimiento del papel central de la plaqueta, en la trombosis en general y en la VTE en particular, es un tema de estudio que se encuentra actualmente en auge.

Los grupos de investigación de Hemostàsia i Trombosi del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona) y de Genètica de Malalties Complexes del Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB-Sant Pau) estudian la VTE desde un punto de vista multidisciplinar con diferentes objetivos entre los que destacan el hallazgo de nuevos factores genéticos de riesgo trombótico y la búsqueda de factores genéticos, biológicos y clínicos capaces de predecir el riesgo de un individuo concreto para desarrollar una trombosis.

Mi colaboración como biólogo dentro de estos dos grupos de investigación sobre la VTE se ha centrado especialmente en aspectos genéticos, biológicos y clínicos de la plaqueta, así como su relación con la VTE. Todos ellos constituyen la base de los estudios que se presentan en esta tesis:

- ⇒ La oportunidad de disponer de una amplia muestra de población sana, incluyendo una apreciable proporción de población infantil ha permitido establecer, mediante la aplicación de métodos estadísticos apropiados, unos intervalos de normalidad de los recuentos e índices plaquetarios, fracción plaquetaria inmadura y función plaquetaria global representativos de la población española (Estudio #1).
- ⇒ El proyecto GAIT 2 (*Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia 2*) pretende encontrar nuevos factores de riesgo en grandes familias, a través de la identificación de nuevos genes,

gracias al análisis de la descomposición de la varianza. El primer paso es determinar cuanta de la variabilidad de diversos fenotipos cuantitativos es debida al efecto de los genes, es decir, su heredabilidad (h^2). En este ámbito, hemos determinado la h^2 de los recuentos e índices plaquetarios, de la fracción plaquetaria inmadura y de parámetros básicos de función plaquetaria (Estudio #2).

El proyecto RETROVE, acrónimo de Riesgo de Enfermedad TROMboembólica VENosa, es un estudio prospectivo de tipo caso-control que pretende identificar factores genéticos, biológicos y clínicos capaces de predecir, en un individuo concreto, el riesgo de presentar VTE. Los recuentos e índices plaquetarios y la función plaquetaria global se han analizado en contexto del proyecto R

Capítulo 1

Introducción

1. Antecedentes históricos

El inicio del siglo XIX aglutinó los antecedentes históricos más relevantes para la identificación y conocimiento de unas pequeñas células anucleadas, denominadas plaquetas, que tienen un papel central en la formación del coágulo gracias a sus estructuras celulares y funcionamiento específicos. La masa plaquetaria mantiene gracias a un equilibrio entre la producción y la destrucción de plaquetas, con algunas variaciones debidas a la edad, el sexo y la genética de cada individuo.

El conocimiento de la plaqueta como entidad independiente se remonta a mediados del siglo XIX, cuando en 1841, el anatomista y fisiólogo inglés George Gulliver (1804–1882) midió, observó y representó por primera vez un componente sanguíneo diferenciado, que definió las plaquetas como “*minute spherules about 1/10,000 of an inch (2.5 μm)*” con aspecto de “*granulated particles after keeping blood for some hours*”. Un año más tarde (1842), el hematólogo inglés William Addison (1803–1881) describió la estructura de un coágulo de fibrina y plaquetas [1]. La plaqueta como tal no fue descrita hasta 1865, cuando el anatomista y fisiólogo alemán Max Shultze (1825–1874) describió “*little spherules of different sizes*” y reconoció que el coágulo estaba formado por “*individual colourless bodies*” [1,2].

Sin embargo, no fue hasta 1882 que el patólogo italiano Giulio Bizzozero (1846–1901) les otorgó su nombre actual (Figura 1.1) [2–4]. Bizzozero observó “*constant blood particle, differing from red and white blood cells*”, anteriormente identificada en numerosos estudiosos, pero que éste denominó como “*piastrine*” en italiano, “*butplättchen*” en alemán “*petites plaques*” o “*plaquettes*” en francés, del que se derivó el término anglosajón “*platelets*”. La descripción morfológica de Bizzozero define a las plaquetas como “*discoid corpuscles without*



Figura 1.1: De izquierda a derecha Giulio Bizzozero (médico e investigador), Albert von Kölliker (médico y botánico) y Camilo Golgi (citólogo e histólogo). Imagen tomada y texto adaptados de una publicación previa [4].

nucleus, consisting of a membrane and matrix in which there were a few dispersed granules” [4]. A su vez, éste corroboró el conocimiento de estudiosos como Gustav Zimmermann (1804–1882) y Max Shultze (1825–1874) caracterizando las plaquetas como “*colourless and transparent particles around 2–3 μm in diameter which circulated in the mesenteric vessels*” [2,4].

Los estudios de Bizzozero fueron claves para entender las funciones plaquetarias en la formación del coágulo. Él fue el primero en afirmar con claridad que las plaquetas eran el tercer elemento morfológico de la sangre e indicó el importante papel que desempeñaban en la hemostasia y la trombosis. A su vez, el análisis de la totalidad de su obra permite afirmar que Bizzozero consideró a la médula ósea como el posible origen de las plaquetas circulantes [4]. A pesar de ello, no

fue hasta 1906 que el megacariocito fue identificado como precursor de las plaquetas por James Homer Wright (1869–1928) [5].

El conocimiento de la trombosis se remonta a 1856, cuando el patólogo prusiano Rudolf Virchow (1821–1902) caracterizó los factores que promueven la trombosis: la hipercoagulabilidad, la estasis venosa y el daño en el endotelio. Con posterioridad, el médico francés Armand Trousseau (1801–1867) describió la estrecha relación entre la tromboflebitis y el carcinoma gástrico [6]. Ya entrado el siglo XX dos moléculas marcan la historia de la trombosis: la heparina y el dicumarol. La primera fue descubierta independientemente por el médico francés Maurice Doyon (1863–1934) y el estadounidense Jay McLean (1890–1957), entre 1911 y 1916, mientras que el bioquímico Karl Link (1901–1978) hizo lo propio con la segunda (1940s) [7,8].

Tras los hallazgos pioneros del siglo XIX en el conocimiento de la plaqueta, éstos se han visto ampliados por una gran variedad y cantidad de estudios durante los siglos XX y XXI. Ya entrado éste último siglo, se ha profundizado en el estudio de la relación entre la plaqueta y el inicio y desarrollo de la enfermedad tromboembólica venosa (VTE).

2. Ultraestructura de la plaqueta

Las plaquetas no activadas son elementos discoides biconvexos de medida variable (2–5 μm de diámetro por 0.5 μm de grosor) con un volumen plaquetario medio de 6,5 a 10,5 fL [9–11]. Su apariencia externa es totalmente lisa, con presencia de un número variable de pequeñas aberturas [12,13]. En cambio, en su interior se advierten cuatro zonas diferenciadas: la zona periférica, la zona sol–gel, los orgánulos y el sistema membranoso (Figura 1.2) [14,15].

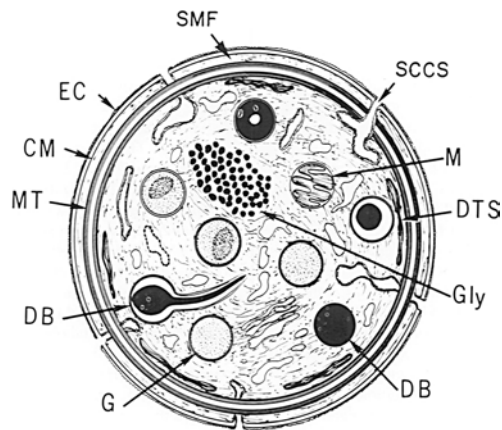


Figura 1.2: Representación esquemática de un corte ecuatorial de la plaqueta en la que se observan la mayoría de sus estructuras y orgánulos. Los componentes localizados en la zona periférica son el glucocálix (EC), la membrana plasmática (CM) y el área submembrana que contiene los filamentos (SMF). La zona sol–gel contiene microfilamentos de actina, túbulos y microtúbulos (MT), así como los gránulos de glucógeno (Gly). Los orgánulos alrededor de la zona sol–gel son las mitocondrias (M), los gránulos α (G) y los gránulos densos (DB). El sistema membranoso se compone principalmente del sistema canalicular abierto (SCCS), en continuidad con la CM, y el sistema tubular denso (DTS). Imagen tomada de una publicación previa [13]. Texto y abreviaciones adaptadas de publicaciones previas [13,15].

La zona periférica incluye el glucocálix, la membrana plasmática y el área submembrana (Figura 1.2 y 1.3). El glucocálix (15–20 nm de grosor) contiene los principales receptores glucoproteicos o glucoproteínas (GP) responsables de la adhesión y la agregación plaquetarias. En el proceso de adhesión, el principal receptor es el complejo GP Ib–V–IX, que se une al factor von Willebrand (vWF). Por su parte, el complejo GP IIb–IIIa, que interacciona con el fibrinógeno, juega un papel central en la agregación [11,16]. La membrana plasmática es una bicapa fosfolipídica asimétrica esencial como soporte de la coagulación, ya que permite una actividad procoagulante. El área submembrana participa en la transmisión de las señales a través del citoesqueleto [9].

La zona sol–gel está principalmente constituida por el citoesqueleto y sus diferentes componentes tubulares, y el glucógeno (Figura 1.2 y 1.3) [14,17]. El citoesqueleto garantiza la forma discoide, característica de la plaqueta en reposo, mientras que durante la activación le proporciona un eficaz mecanismo contráctil. Los principales componentes del citoesqueleto plaquetario son los microtúbulos y los microfilamentos. Los microtúbulos (25 nm de diámetro) son los responsables de la forma discoide de la plaqueta, al formar un anillo ecuatorial, y también facilitan la secreción plaquetaria. Los microfilamentos, de actina y miosina, constituyen el principal sistema contráctil de la plaqueta. Ocasionalmente pueden encontrarse gotas lipídicas y diferentes sustancias solubles, como cationes de calcio.

La zona de orgánulos (Figura 1.2 y 1.3) está integrada principalmente por los gránulos plaquetarios (gránulos α , gránulos densos o δ) y, testimonialmente, presenta cuerpos multivesiculares (30–70 nm de diámetro). Los gránulos α (200–500 nm de diámetro), originados en las cisternas *trans* del complejo de Golgi, son los más numerosos (~40–80 por plaqueta). Su morfología es característica (con núcleo excéntrico más denso), y contienen sustancias que facilitan la adhesión y la

agregación plaquetaria (fibrinógeno, vWF y GP IIb–IIIa), factores de la coagulación, factor plaquetario 4, β -tromboglobulina, y factores de crecimiento (factor de crecimiento derivado de las plaquetas o PDGF) que producen la regeneración del endotelio. Los gránulos densos (200–300 nm de diámetro), menos numerosos (~5 por plaqueta) que los gránulos α , contienen elevadas concentraciones de calcio, serotonina, nucleótidos y pirofosfatos [9,16].

La existencia de estructuras inespecíficas en las plaquetas se centra principalmente en dos tipos de orgánulos: los lisosomas y las mitocondrias (Figura 1.2 y 1.3), las cuales poseen una función energética [9,14].

Por último, el sistema membranoso de la plaqueta está constituido por el sistema canalicular abierto y el sistema tubular denso así como, ocasionalmente, por complejos membranosos mixtos. El primero es una estructura única y extensa generada por la invaginación de la bicapa fosfolipídica, que desempeña tres funciones principales [9,12]. En primer lugar, la de ejercer de vía de entrada a la plaqueta de elementos externos (endocitosis), así como de ruta de secreción de los gránulos α (exocitosis). En segundo lugar, la de ser reservorio de membrana y facilitar la formación de pseudópodos y el proceso de adhesión y agregación. Por su parte, el sistema tubular denso es una estructura estanca de canales derivada del retículo endoplásmico, que constituye el principal reservorio de calcio plaquetario [9,14].

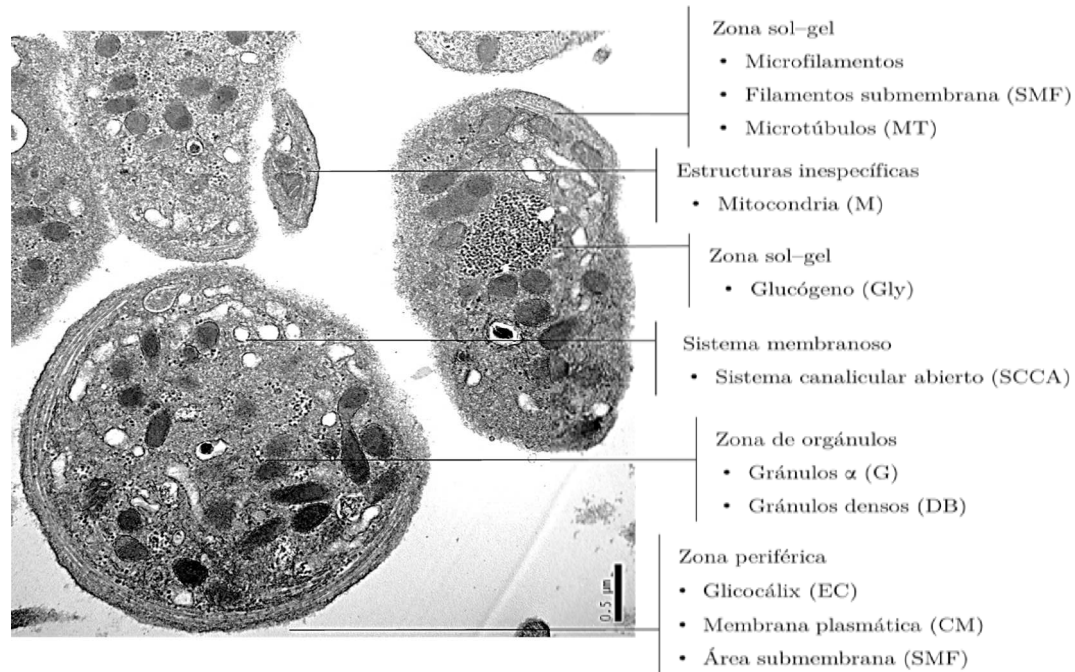


Figura 1.3: Estructuras y orgánulos plaquetarios procedentes de una muestra sanguínea, sin anticoagulantes. La imagen ha sido obtenida por microscopía electrónica de transmisión ($\times 20\ 000$). Imagen realizada en el marco del proyecto GAIT 2, perteneciente a nuestro grupo. Siglas presentes en la Figura 1.2. adaptación de publicaciones previas [13,15].

3. Plaqueta y hemostasia

El sistema hemostático es el mecanismo que impide una pérdida excesiva de sangre mediante el equilibrio entre procesos procoagulantes y anticoagulantes. De este modo, sus diferentes componentes (plaquetas, células endoteliales y factores de la coagulación) garantizan la integridad del sistema circulatorio [18,19]. La hemostasia, comprende la formación del trombo plaquetario (Figura 1.4) o hemostasia primaria y del coágulo o hemostasia secundaria [20,21].

3.1. Formación del trombo plaquetario

El endotelio es el tejido que recubre la zona interna de todos los vasos sanguíneos, incluido el corazón (endocardio). Actúa de barrera entre los vasos sanguíneos y el tejido adyacente, regula el tono y la permeabilidad vasculares, inhibe la coagulación y la agregación plaquetaria y modula el proceso de fibrinólisis [18,21].

En condiciones fisiológicas, el endotelio garantiza la continuidad del vaso sanguíneo. En caso de ruptura, quedan expuestas las moléculas presentes en la matriz subendotelial, las cuales desencadenarán la activación plaquetaria, que engloba diversos procesos, que comienzan con la adhesión y finalizan con la agregación irreversible, la secreción y la exposición de una superficie procoagulante [22]. Las principales moléculas son el colágeno y algunos factores procoagulantes y protrombóticos que favorecen la adhesión plaquetaria, como el factor vWF, el factor activador de plaquetas (PAF) o el factor tisular (TF) [18,23]. El subendotelio dañado también puede aportar fibrinógeno, laminina, fibronectina y trombospondina [24].

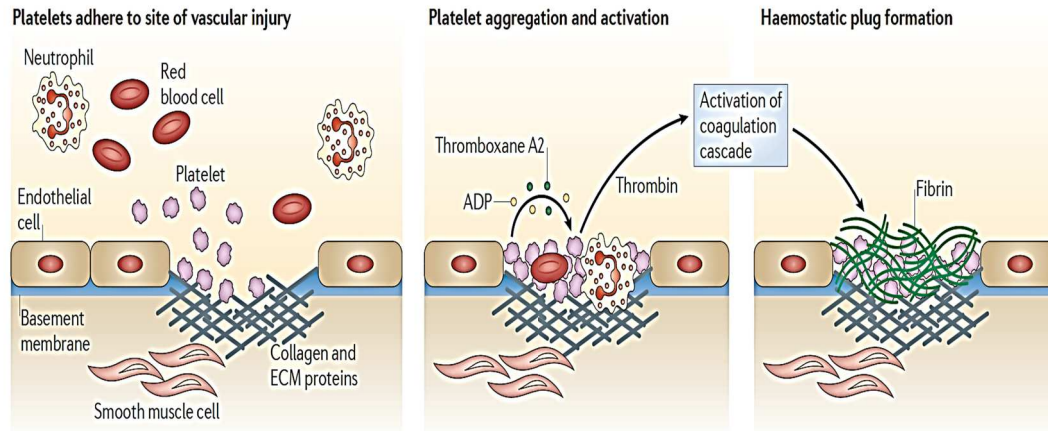


Figura 1.4: Representación esquemática de las funciones plaquetarias dentro de la hemostasia. La rotura del vaso sanguíneo expone un conjunto de moléculas de la matriz extracelular (ECM), como el colágeno, y facilita el proceso de adhesión de las plaquetas a su alrededor. De este modo, se inicia la agregación plaquetaria y la liberación de mediadores, como el ADP y el tromboxano A₂ (TxA₂). La activación de las plaquetas produce la liberación de trombina, que cataliza el inicio de la formación del coágulo de fibrina. Imagen tomada y adaptado de una publicación previa [23].

Tabla 1.1: Principales receptores de la membrana plaquetaria¹.

Reclutamiento, adhesión y agregación		
GP Ib-IX-V	LRR ^a	P-selectina, trombina, trombospondina, vWF
GP VI (FcR γ)	Inmunoglobulinas	Colágeno, laminina
GP Ia-IIa	Integrinas	Colágeno
GP IIb-IIIa	Integrinas	Fibrina, fibronectina, fibrinógeno, trombospondina, vitronectina, vWF
GP IV (CD36)	Scavenger B	Colágeno, trombospondina
Amplificación del coágulo de fibrina		
P2Y1	Proteína G	ADP
P2Y12	Proteína G	ADP
PAR-1	Proteína G	Trombina
PAR-4	Proteína G	Trombina
Estabilización del coágulo de fibrina		
P-selectina	CLEC-2 ^b	PSGL-1 ^d GP Ib TF
PEAR-1	EGF-like domine ^c	?
Retracción del coágulo de fibrina		
PECAM-1 (CD31)	Inmunoglobulinas	Colágeno, PECAM-1

¹ De izquierda a derecha se exponen los diferentes receptores, la familia a la que pertenecen, los ligandos que unen y por último la principal función que ejercen dentro de la función plaquetaria (reclutamiento, adhesión y agregación), así como dentro del coágulo de fibrina (amplificación, estabilización y retracción).

^a Familia glicoproteínas ricas en leucina o *leucine-rich repeat*.

^b Familia receptor tipo 2 de lectinas tipo C o *C-type lectin receptor 2*.

^c Familia de proteínas similares al factor de crecimiento epidérmico o *epidermal growth factor-like domain*.

^d Ligando 1 de la glicoproteína P-selectina o *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1).

La adhesión plaquetaria es el primer paso para la formación del trombo plaquetario o tapón hemostático (Figura 1.5). En una primera fase, denominada de contacto, la exposición del colágeno subendotelial (tipo I y III) y la liberación de vWF por parte de las células endoteliales juegan un papel fundamental en el proceso. En condiciones de alto *shear stress* el vWF es el responsable de la adhesión mediante la unión de su dominio A1 con la GP Ib (del complejo GP Ib-V-IX), y la de su dominio A3 con el colágeno [22,25]. En una segunda fase, denominada de extensión o *spreading*, la velocidad de las plaquetas se reduce facilitando la interacción irreversible de las plaquetas con el colágeno subendotelial (Figura 1.5) [11,26,27]. Sin embargo, en condiciones de bajo *shear stress*, la unión puede ser vía colágeno (tipos I, III, IV y VI), fibronectina, laminina e incluso trombospondina [25]. La unión de la GP Ib-V-IX con el vWF es capaz de desencadenar por sí sola la activación plaquetaria, pero existen otros mecanismos paralelos de activación como son la unión específica vía colágeno subendotelial, mediante la GP Ia-IIa y GP VI, o vía trombina, mediante receptores purinérgicos (P2X, P2Y₁ o P2Y) o por receptores activadores de proteasas (PAR-1 y PAR-4) [25,28].

La activación plaquetaria genera una reestructuración de los componentes del citoesqueleto que implica un cambio de forma de las plaquetas y la extensión de éstas sobre el subendotelio, a la vez que desencadena la movilización masiva de calcio y facilita la interacción de la GP IIb-IIIa con el fibrinógeno para producir la agregación de las plaquetas entre sí [22,25,29]. Paralelamente, la reorganización del citoesqueleto durante la agregación conlleva una movilización de los orgánulos plaquetarios hacia el centro de la célula, que inducirá un proceso denominado degranulación plaquetaria o *release reaction* [26]. Dicho proceso implica la liberación del contenido de los gránulos α y los gránulos densos.

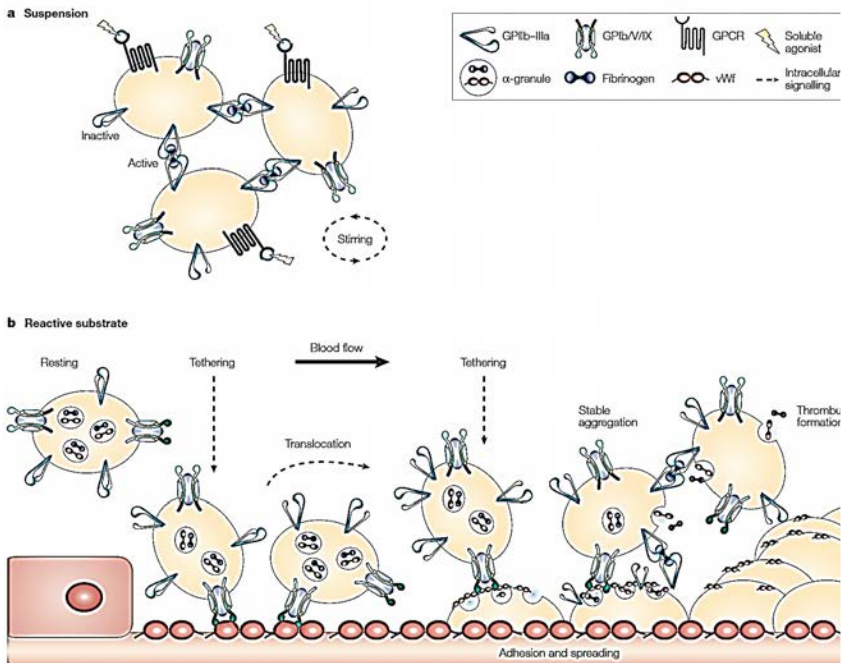


Figura 1.5: Mecanismo de *spreading*, adhesión y agregación plaquetaria en la formación del trombo. **(a)** La unión de la glicoproteína plaquetaria (GP) IIb-IIIa con el fibrinógeno en suspensión favorece la agregación plaquetaria. En la figura, la unión del agonista (véase Tabla 1.1) a su receptor, en este caso un receptor acoplado a proteína G (GPCR) induce la activación plaquetaria. Ésta provoca un cambio conformacional del dominio extracelular de la GP IIb-IIIa que permiten la unión al fibrinógeno y desencadena la agregación plaquetaria. Los dímeros de fibrinógeno unen GP IIb-IIIa de plaquetas adyacentes. **(b)** En condiciones de cizallamiento elevado el proceso de *spreading* comprende diferentes fases (*resting*, *tethering* y *translocation* o *rolling*). En la fase inicial de *spreading*, la agregación plaquetaria es dependiente del proceso *tethering*, desencadenado por la expresión de GP Ib en la superficie plaquetaria. La adhesión de ésta con el factor von Willebrand (vWF) subendotelial facilitará el proceso de *translocation* o *rolling*. Esta concatenación de eventos inmovilizarán por completo la plaqueta dando la agregación estable, mediada por la unión de GPIIb-IIIa al vWF, fibrinógeno y fibronectina, entre otros (véase Tabla 1.1). Imagen tomada y texto adaptado de una publicación previa [27].

Al mismo tiempo, la polarización de la membrana plaquetaria estimula la formación del tromboxano A_2 (TxA_2). El TxA_2 , el cual a través de su receptor específico, es un potente inductor de la agregación y activación plaquetaria. Éste, conjuntamente a otras sustancias activadoras (serotonina, ADP o epinefrina) forman en un eficaz sistema de amplificación de la respuesta plaquetaria [29].

3.2. Plaqueta y coagulación

El proceso fisiológico de la coagulación tiene como función principal el mantenimiento de la integridad del sistema circulatorio tras una lesión endotelial. La intervención de enzimas del tipo serina proteasa (hidrolasas), factores y cofactores sobre la superficie celular, principalmente plaquetaria pero también endotelial, permite la estabilización del trombo y la formación del coágulo de fibrina [18,19]. La cascada de la coagulación es el resultado de la acción de dos vías: intrínseca y extrínseca (Figura 1.6), que convergen en la vía común. Esta división, obedece más a criterios *in vitro* que a la secuencia de los procesos fisiológicos (iniciación, amplificación, propagación, estabilización y fibrinólisis) propuestos en un modelo celular o *in vivo* [18,21].

Dos procesos marcan la fase de iniciación: la adhesión plaquetaria (véase apartado 3.1) y la exposición de TF. La expresión de TF en superficie, ya sea constitutiva (fibroblastos) o inducida (células endoteliales, monocitos y macrófagos) como respuesta al daño endotelial, inicia la cascada de la coagulación activando el factor VII. *In vivo*, el complejo TF-VIIa activa dos complejos enzimáticos formados por los factores IX, IXa y VIIIa (complejo tenasa, vía intrínseca), y los factores X, Xa y Va (complejo protrombinasa, vía extrínseca) [30,31]. Este último es suficiente para la generación de una pequeña cantidad de trombina, pero insuficiente para desencadenar la formación de fibrina [18,21,30].

Las pequeñas cantidades de trombina generadas con anterioridad permiten iniciar la fase de amplificación. Ello implica la activación del resto de factores de la coagulación (factor V, VIII y XI) y la estimulación de la activación y agregación plaquetarias [21,30]. A su vez se aportan grandes cantidades de aniones de calcio procedentes del interior de la plaqueta y de las superficies fosfolípídicas. Todo ello provocará la generación de trombina en grandes cantidades [18,30].

Así, la continuidad en la generación de trombina (fase de propagación) se asegura gracias a la presencia de los dos complejos (tenasa y protrombinasa), descritos en la fase de iniciación. En este punto, la plaqueta contribuye tanto a la continuidad en la generación de trombina, como a la correcta ubicación del coágulo de fibrina [21,30]. Recientes estudios muestran que una población plaquetaria estimulada por trombina y colágeno (COAT) muestra una mejor capacidad de generar trombina, debido a la presencia de ambos complejos en su superficie y de receptores plaquetarios específicos para el vWF y el colágeno [30,32]. Estos últimos, a su vez, permiten la correcta ubicación de la formación de la trombina, y consecuentemente, la correcta ubicación y formación del coágulo de fibrina [21,30].

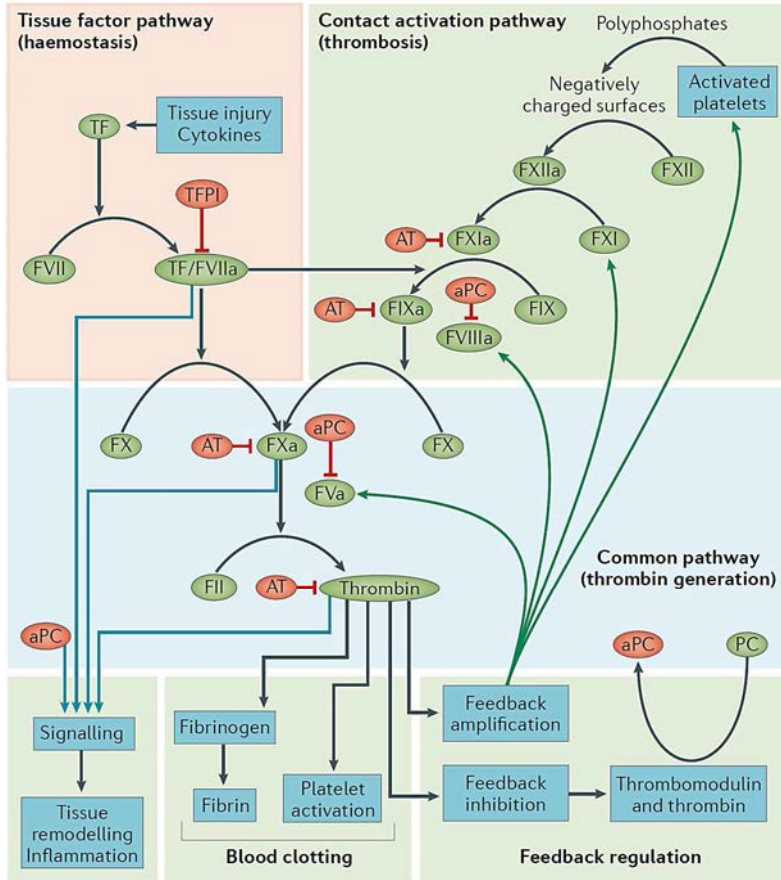


Figura 1.6: Representación esquemática de la vías intrínseca y extrínseca dentro de la cascada de la coagulación. En la vía intrínseca (*tissue factor pathway*), el daño tisular o el proceso inflamatorio (citocinas) inducen la expresión de TF. La formación del complejo tenasa (FT-VIIa) activa el factor X (FX), que convierte la protrombina en trombina. En la vía extrínseca (*contact activation pathway*) necesita de los polifosfatos y fosfolípidos expuestos durante la activación de la plaqueta. Una cascada de reacciones reguladas, iniciada por el factor XII (FXII), permite la activación del factor X (FX) y la posterior generación de trombina a partir del complejo protrombinasa (FXa-Va). Imagen tomada de una publicación previa [31]. Texto modificado de dos publicaciones previas [30,31].

4. Población plaquetaria circulante

El aporte de plaquetas a la circulación sanguínea depende de la generación y la maduración de los megacariocitos medulares (megacariocitopoyesis) para producir y liberar plaquetas (trombocitopoyesis). Este último proceso está principalmente regulado por la trombopoyetina (TPO) y numerosas interleucinas (IL-1, IL-6 y IL-11), entre otras sustancias [9,33]. Así, se induce la formación de prolongaciones pseudopódicas en el área marginal de los megacariocitos, que generan estructuras alargadas y cilíndricas. Estas estructuras de 120 μm de largo y 2,5 μm de diámetro, denominadas proplaquetas, se liberan en los sinusoides medulares, y maduran hasta formar plaquetas (Figura 1.7).

El número de plaquetas producidas y extravasadas al torrente sanguíneo oscila entre $35\text{--}100 \cdot 10^9/\text{L}$ por día, de las cuales dos tercios se encuentran libres en la circulación [9,10,33]. El tercio restante se encuentra retenido o secuestrado en el bazo el cual, además, mediante sus propias células fagocíticas, es el principal órgano encargado de la destrucción fisiológica de las plaquetas [10].

En un individuo adulto, las plaquetas circulantes mantiene un nivel constante de $150\text{--}450 \cdot 10^9/\text{L}$, con una vida media de entre 8 a 10 días [9,10,34]. Se describen valores superiores en las mujeres y la población infantil, así como fluctuaciones estacionales [10,34–36]. En la población general se ha abordado en profundidad la disminución del recuento plaquetario con la edad, así como la influencia del sexo [34,37]. La disminución del recuento plaquetario en la población anciana es del 35% (hombres) y del 25% (mujeres) respecto a la infantil [34].

El volumen medio fluctúa entre 6,5–10,5 fL, con un elevado grado de dispersión entre 2,2–21 fL, y éste aumenta con la edad [10,38–40]. La masa plaquetaria total o plaquetocrito (PCT) muestra unos intervalos relativamente amplios de 0,10–0,45%, con un repunte descrito en niñas

prepuberales [35,39]. De este modo, y en condiciones fisiológicas, el recuento de plaquetas y el MPV determinan una correlación inversa y no lineal conocida como nomograma de Bessman [41,42]. A su vez, esta relación ayuda al mantenimiento de una función hemostática constante.

El ensayo de función plaquetaria o *platelet function assay* (PFA), realizado con el analizador PFA-100®, simula la hemostasia primaria tras una pequeña lesión vascular en presencia del agonista expuesto a elevados índices de cizallamiento [43,44]. Se hace circular sangre anticoagulada por un capilar que se recubre de una membrana de colágeno y un agonista plaquetario (ADP o epinefrina) [44]. La membrana contiene un orificio que se irá cerrando a medida que las plaquetas activadas por el agonista se adhieran, agreguen y acaben por formar el tapón plaquetario. El tiempo requerido para oclusión se denomina tiempo de obturación o *closure time* (CT) [45]. En la población adulta sana se han descrito valores de CT de 85–120 segundos, para el cartucho de colágeno–ADP, mientras que para el cartucho de colágeno–epinefrina los valores de CT, de 110–161 segundos [44]. Diferentes estudios han descrito que ni la edad ni el sexo influyen sobre éstos [46,47]. Sin embargo, un estudio coreano describe cierta influencia de la edad y unos valores de CT más alargados en mujeres que en hombres, para ambos cartuchos [48].

Es conocido que el consumo estimado de plaquetas en la población sana es de $7 \cdot 10^9$ /L por día [10]. Una subpoblación joven de plaquetas, con mayor capacidad funcional y presencia de RNA en su interior, aseguran la reposición y el nivel constante de plaquetas en sangre. Se denominan plaquetas reticuladas (RP) o fracción plaquetaria inmadura (*immature platelet fraction*, IPF) y suponen entre un 1–2% de la masa plaquetaria total [10,49]. La presencia de RNA se detecta mediante una tinción de la muestra con colorantes específicos (*polimethine* y oxacina) para su posterior detección por

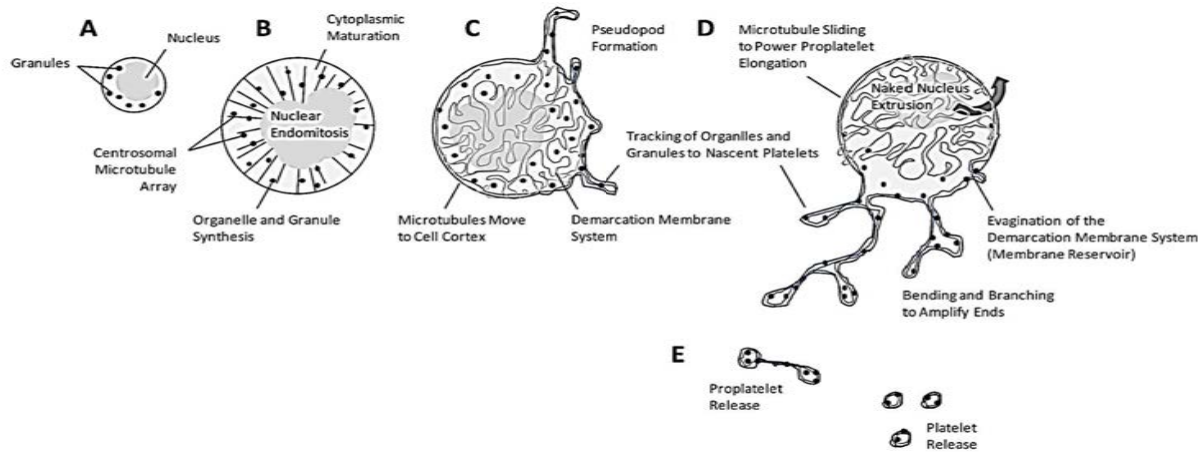


Figura 1.6: Representación esquemática de la formación de proplaquetas y liberación de plaquetas por parte del megacariocito (trombocitopoyesis). El megacariocito inmaduro inicia un proceso de maduración mediante endomitosis nucleares, en el que (a) se sintetizan y (b) maduran los elementos del citoesqueleto y algunos orgánulos. (c) Translocación de microtúbulos hacia la zona marginal del megacariocito para iniciar una incipiente síntesis de proplaquetas. La membrana de demarcación actúa como reservorio de membrana para la producción y crecimiento de las proplaquetas. Se inicia la formación de pseudópodos. (d) La producción de proplaquetas se inicia cuando un polo del megacariocito empieza a erosionarse. Los microtúbulos se encargan de dirigir elementos, como los orgánulos, hacia la proplaqueta. Una rápida retracción separa las proplaquetas del megacariocito, a la vez que el núcleo de éste se descompone. (e) La última fase convierte la totalidad del citoplasma megacariocítico en proplaquetas. Imagen modificada de una publicación previa [33]. Texto adaptado de las mismas publicaciones [9,33].

difracción óptica o citometría de flujo [50,51]. Algunos estudios en la población europea han estimado unos valores del IPF en torno al 2,6–3,4% [52,53].

5. Plaqueta y trombosis

La rotura de un vaso sanguíneo desencadena un mecanismo fisiológico para minimizar la pérdida de volumen de sangre y el daño tisular (véase apartado 3) [54]. Sin embargo, cambios en la pared del vaso sanguíneo, el flujo o los componentes circulantes pueden asociarse a alteraciones de la hemostasia primaria y secundaria, como ya describió Rudolf Virchow [6,54]. Por tanto, la trombofilia, se define como la propensión anormal de un individuo a generar trombos, tanto arteriales como venosos [55].

5.1. Plaqueta y fisiopatología de la trombosis

5.1.1. Trombosis arterial

La trombosis arterial se define como el proceso de formación de un coágulo patológico que causa la interrupción del flujo normal de sangre en el sistema arterial íntimamente ligada a la formación de una placa aterosclerótica subyacente [56].

La formación de una placa aterosclerótica se inicia con una disfunción endotelial, seguida de la expresión de moléculas proinflamatorias, principalmente selectinas e integrinas, presentes tanto en el endotelio como en los leucocitos [57]. Una vez el endotelio está activado las plaquetas se adhieren y agregan a éste (véase apartado 3.1), estimulando una acción procoagulante en la zona. Paralelamente, algunos factores de crecimiento plaquetario, como el PDGF y el factor de crecimiento epidérmico (EFG), estimulan la migración de las células musculares lisas hacia la zona afectada. Éstas son responsables de generar una matriz fibrosa inestable en la zona. En un estadio avanzado, la inflamación persistente y localizada provoca un deterioro de la íntima del vaso, que estimula la proteólisis y la apoptosis celular. Todo ello acaba por dañar el endotelio de manera irreversible,

desencadenando la rotura de éste y dando lugar a la formación intravascular del trombo [56–58]

5.1.2. Trombosis venosa

La VTE se define como el proceso de formación, crecimiento y/o fragmentación de un coágulo patogénico que interrumpe el flujo normal de sangre en el sistema venoso profundo. La acción de múltiples genes y su interacción con factores ambientales determinarán en cada individuo el grado de susceptibilidad a padecer la enfermedad [59]. La incidencia de la VTE es de 1–3‰ individuos por año, siendo las localizaciones más frecuentes la trombosis venosa profunda de las extremidades inferiores y el tromboembolismo pulmonar [55,60].

La plaqueta no solo juega un papel central en la trombosis arterial (véase apartado 5.1), también muestra un papel destacado en la patogénesis de la VTE. Recientemente se han propuesto tres mecanismos por los que la plaqueta contribuye de manera esencial al inicio de la VTE: reclutamiento de leucocitos, activación vía trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) y, generación de micropartículas (MP) (Figure 1.8) [24].

En primer lugar, el reclutamiento de leucocitos se produce gracias a la interacción de la GP Ib α con el vWF y la P-selectina subendoteliales [24]. Este proceso se ha demostrado clave en la estimulación de la formación del coágulo y el inicio de la VTE. En el proceso inflamatorio intrínseco, estos agregados plaqueta–leucocito aumentan la transcripción y expresión del TF y, en consecuencia, se estimula la vía extrínseca de la coagulación [61]. La segunda vía se produce por el acúmulo de histonas en los NETs que favorecen la activación de las plaquetas vía receptores tipo Toll (TLR). La estimulación de la generación de trombina aumenta el crecimiento del trombo en el inicio de la VTE [62]. Por último, la generación de MP desencadena un estado procoagulante que favorece el inicio de la VTE [24,63].

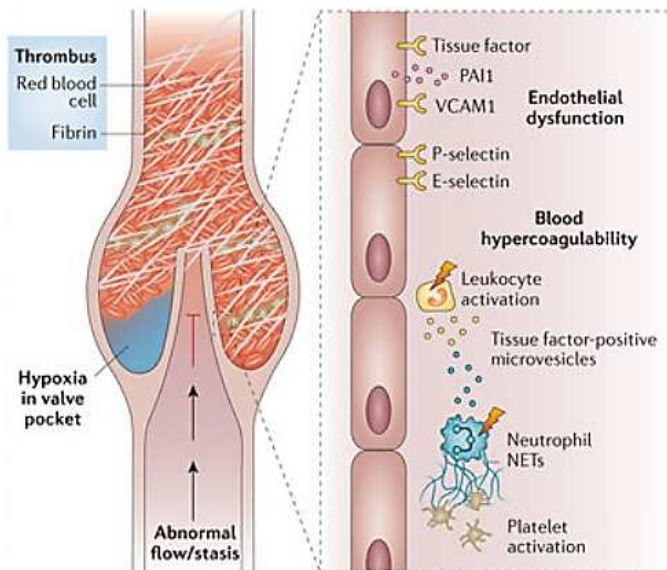


Figura 1.8: Mecanismos trombogénicos causantes de la trombosis venosa profunda. La estasis venosa induce la disfunción y expresión de moléculas de adhesión, como la molécula 1 de adhesión a célula vascular (VCAM-1), P-selectina y E-selectina, que favorecen la adhesión de los leucocitos. La actividad procoagulante se estimula por regulación negativa de factores antitrombóticos o positiva de antifibrinolíticos y procoagulantes. En este sentido, el inhibidor 1 del activador del plaminógeno (PAI-1), el factor tisular (TF) o la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) o micropartículas (MP) pueden inducir zonas trombogénicas en las valvas. Todo ello provoca la oclusión de la vena por acúmulo de fibrina y hematíes. Imagen y texto modificados de una publicación previa [60].

5.2. Factores adquiridos de riesgo trombótico

En condiciones proinflamatorias y/o procoagulantes, diversos factores pueden predisponer o favorecer la formación de trombos patológicos, tanto a nivel arterial como venoso. Los principales factores de riesgo que se asocian a trombosis arterial son la hipertensión, la diabetes o los niveles elevados de colesterol y, aunque las condiciones fisiopatológicas en que se forman los trombos arteriales y venosos difieren, recientes revisiones han puesto de manifiesto que existen

Tabla 1.2: Principales factores de riesgo de trombosis¹.

Trombosis arterial	Compartidos	Trombosis venosa
Hipertensión	Edad avanzada	Inmovilización
Diabetes	BMI ^a elevado	Traumatismo
Colesterol elevado	Tabaquismo	Cirugía
Obesidad abdominal	Historia familiar de MI ^b	Cáncer activo
Daño endotelial	Trombofilia	Embarazo/puerperio
	Estasis	Viajes de larga distancia
	Tratamiento hormonal sustitutorio	Anticonceptivos orales
	Inflamación	Factores genéticos ^c
		Trombosis venosa previa

¹ Tabla adaptada de dos publicaciones previas [64–66]

^a Índice de masa corporal o *body mass index* (BMI).

^b Infarto de miocardio o *myocardial infarction* (MI).

^c Los factores genéticos incluyen: las deficiencias de antitrombina, proteína C y proteína S, las mutaciones en el factor V Leiden, la protrombina (20210A), el factor XIII (34val), el fibrinógeno (G 10034T), la difibrinogenemia y el grupo no O del sistema sanguíneo ABO.

diversos factores de riesgo compartidos entre la ambas patologías (Tabla 1.2) [64,65].

En este sentido, algunos de los factores de riesgo que se han asociado clásicamente a la VTE son la inmovilización, la cirugía, el tener antecedentes de trombosis previas o deficiencias y mutaciones en factores de la coagulación (factores genéticos), entre otros (Tabla 1.2) [66]. Paralelamente, estudios recientes han analizado la asociación entre la variabilidad en los otros parámetros, como los recuentos, volúmenes y/o función plaquetarias, y la patogenia de la VTE [67,68].

En este sentido, numerosos estudios en pacientes oncológicos han evidenciado una clara asociación entre recuentos elevados de plaquetas (superiores a $300\text{--}350 \cdot 10^9/\text{L}$) y un mayor riesgo de VTE (Tabla 1.3) [69–72]. En la población general, sin embargo, el recuento elevado de plaquetas no muestra una clara asociación con el riesgo de VTE.

Estudios, como Tromsø y el *Longitudinal Investigation Thromboembolism Etiology* (LITE), no han identificado el recuento de plaquetas como indicador de riesgo de VTE [73,74]. Sin embargo, Zakai *et al* describe una asociación entre recuentos de plaquetas superiores a $350 \cdot 10^9/L$ y el riesgo de VTE, con una *odds ratio* (OR) no ajustada de 2,5 (Tabla 1.3) [75].

El volumen plaquetario, por su parte, se ha asociado con el riesgo de VTE. Valores superiores a 9,5 fL se han asociado a una *hazard ratio* (HR) de 1,3 con un intervalo de confianza (CI) del 95% entre 1,0–1,7, para el riesgo de VTE total, y de 1,5 con un CI del 95% entre 1,1–2,3, para el riesgo de VTE espontánea [73].

Tabla 1.3: Tabla resumen del riesgo de tromboembolismo venoso (VTE) asociado a recuento y volumen plaquetarios¹.

Parámetro	Muestra ^a	Valor ^d	Riesgo (95% CI) ^e	Referencia
PLT	188 (65)	350	2.5 (1.3–4.8)	[75]
	2082 (129) ^b	295	1.98 (1.21–3.23)	[69]
	665 (44) ^b	443	3.50 (1.52–8.02)	[70]
	3003 (58) ^b	350	2.81 (1.63–4.93)	[72]
	381 (30) ^b	300	1.65 (1.09–2.64)	[71]
MPV	25923 (445)	9.5	1.5 (1.1–2.3)	[73]
	98 (247) ^c	7.4	3.65 (1.38–9.64)	[77]
	589 (40) ^b	7.3	2.32 (1.03–5.23)	[76]

¹ Tabla adaptada de una publicación previa [67]. Las abreviaturas indican recuento de plaquetas (PLT) y volumen plaquetario medio (MPV).

^a Número total de muestra. Entre paréntesis se exponen las trombosis venosas incluidas en los diferentes estudios.

^b Estudios con pacientes oncológicos.

^c Estudios con antecedentes de trombosis y/o aborto con síndrome antifosfolípido (APS).

^d Los valores superiores o iguales a los que se ha asociado riesgo de VTE. El PLT se da en $10^9/L$, mientras que el MPV se muestra en femtolitros (fL).

^e Riesgo de VTE con intervalo de confianza (CI) del 95% mostrado entre paréntesis.

Otros estudios más recientes han ahondando en la relación existente entre el volumen plaquetario y el riesgo de VTE (Tabla 1.3) [76,77]. Así se ha sugerido que un recuento absoluto de la subpoblación joven de plaquetas se puede asociar a un aumento de riesgo trombótico, debido a su mayor actividad y volumen respecto a la población de plaquetas adultas [78,79]. En este sentido, una elevada función plaquetaria puede representar un factor de riesgo independiente de VTE [67].

El concepto de hiperagregabilidad plaquetaria se define como la capacidad de las plaquetas para una mayor activación *in vitro* a bajas concentraciones de algunos agonistas, como el péptido-activador 6 del receptor de la trombina (TRAP-6), el colágeno, el ADP o la epinefrina [67,80,81]. En este sentido la hiperagregabilidad no se ha asociado de manera clara con el riesgo de VTE, de la misma manera que no se ha probado la asociación entre los valores de CT cortos del PFA y el riesgo de VTE.

5.3. Determinantes genéticos de las plaquetas y riesgo de trombosis venosa

En el ámbito de la plaqueta, las alteraciones mendelianas o de tipo monogénico implican variaciones en la funcionalidad plaquetaria [67]. De este modo, son considerados factores genéticos de riesgo de VTE algunos polimorfismos en las GP de membrana que conllevan tanto un incremento en la densidad como en la afinidad de las mismas [82,83]. A su vez, como algunas alteraciones en los genes *GAS6* (*growth arrest-specific 6* o gen 6 específico de detención de crecimiento) y *PEAR-1* (*platelet endothelial aggregation receptor-1* o gen del receptor 1 de agregación al endotelio) se han asociado como factor de predisposición a un aumento del riesgo trombótico mediante un incremento en la hiperagregabilidad plaquetaria (síndrome de las plaquetas pegajosas o *sticky platelets syndrome* (SPS)) [67].

Tabla 1.4: Tabla resumen de herabilidades (h^2) obtenidas en parámetros plaquetarios¹.

Parámetro	Etnia ^a	Hereditabilidad	Referencias
PLT	Caucásica (12517)	54%	[89]
	Caucásica (1101)	55%	[87]
	Caucásica (712 ^b)	57%	[94]
	Caucásica (687, 1083)	60%	[88,90]
	Caucásica (6111)	64%	[86]
	Caucásica (385 ^b)	80%	[92]
	Caucásica (92 ^b)	86%	[91]
MPV	Africana (321)	67%	[90]
	Caucásica (687)	55%	[90]
	Caucásica (1083)	73%	[88]
	Caucásica (1101)	79%	[87]
	Caucásica (92 ^b)	88%	[91]
PCT	Africana (321)	71%	[90]
	Caucásica (1101)	53%	[87]
PDW	Caucásica (1101)	37%	[87]
PFAadp	Caucásica (306)	19%	[93]
PFAepi	Caucásica (687)	24%	[90]
	Caucásica (301)	51%	[93]
	Africana (321)	61%	[90]

¹ Tabla adaptada de una publicación previa [85]. Las abreviaturas indican recuento de plaquetas (PLT), volumen plaquetario medio (MPV), plaquetocrito (PCT), amplitud de distribución de los volúmenes plaquetarios (PDW), y tiempos de obturación o *closure time* (CT) del PFA-100[®] para cartuchos de ADP (PFAadp) y epinefrina (PFAepi).

^a Número de individuos analizados en cada estudio indicado entre paréntesis.

^b Estudios realizados en gemelos y/o mellizos.

Estos factores genéticos mendelianos no descartan la existencia de nuevos genes que predispongan a padecer la VTE si se considera a ésta como una enfermedad compleja resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales. La hereditabilidad (h^2) o componente genético de la predisposición individual a sufrir una VTE ha sido

estimada en un 60% y en parte se ha asociado a alteraciones en genes que codifican factores de la coagulación [59,84]. Sin embargo, aún no se ha realizado ningún análisis exhaustivo de la variabilidad debida al efecto de los genes, que está presente en los parámetros plaquetarios [85]. En este sentido, la h^2 ha sido estimada sólo para el recuento e índices plaquetarios, y parcialmente para los parámetros del test *in vitro* del analizador PFA-100® (Tabla 1.4) [86-94].

Un excelente indicador del proceso de adhesión y en general, de la hemostasia primaria son los CT del test *in vitro* del analizador PFA-100® [46,95]. Algunos estudios han descrito los intervalos de normalidad para los CT, así como la influencia que variables como la edad y el sexo tienen sobre éstos (véase apartado 4) [45,46]. En la actualidad, su utilidad clínica se centra en el diagnóstico diferencial de enfermedades hemorrágicas [96,97]. Sin embargo, numerosos artículos asocian hiperreactividad plaquetaria en pacientes con enfermedad cardiovascular y CT cortos [46,98-100].

6. Proyectos de investigación en trombosis venosa

6.1. Proyecto GAIT 2

El proyecto GAIT 2 (*Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia 2*) ha sido diseñado y realizado por la Unitat d'Hemostàsia i Trombosi del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona y la Unitat de Genòmica i Malalties Complexes del Institut d'Investigació Biomèdica de Sant Pau (IIB-Sant Pau), en colaboración con diversos grupos de investigación de instituciones nacionales e internacionales. Tras la primera fase, iniciada en 1995 (proyecto GAIT 1), en 2006 se diseñó e inició el reclutamiento de individuos en el proyecto GAIT 2, finalizándose en 2010. En la actualidad, se están llevando a cabo diversos estudios con datos y muestras obtenidas en dicho período.

El objetivo principal del proyecto GAIT es la identificación de genes que determinan la variabilidad de los parámetros relacionados con la hemostasia y especialmente, la localización de aquellos que influyen sobre el riesgo de VTE [59,101]. Además, otros objetivos incluidos específicamente en el proyecto GAIT 2 consisten en la replicación de los resultados obtenidos en el proyecto GAIT 1, el análisis de la variabilidad genética debida a la expresión de RNA, la exploración de otros sistemas fisiológicos, como la estructura y función de la plaqueta, o la obtención de mayor información clínica.

La metodología para la identificación de genes se basa en el análisis de rasgos o parámetros cuantitativos en familias [59,103]. Un parámetro cuantitativo es una variable continua que se encuentra determinada simultáneamente por múltiples genes, factores ambientales y la posible interacción entre ambos. En nuestro trabajo, por ejemplo, se analizarán diferentes mediciones relacionadas con la biología plaquetaria [102].

En las familias, cuanto mayor es el grado de parentesco entre dos individuos, mayor cantidad de genes (alelos) idénticos son compartidos por ambos y viceversa. Para cuantificar la variabilidad, expresada como proporción de la varianza, de una variable cuantitativa debido al efecto exclusivo de los genes, se usa un parámetro denominado h^2 . Ésta se define como la proporción de la varianza total debida a la varianza genética y comprende valores entre 0 y 1, siendo este último valor un indicador de que el componente genético es el causante exclusivo de la variabilidad. La estimación de la h^2 es un paso previo indispensable para localizar los *loci* o genes, puesto que si el parámetro cuantitativo muestra una h^2 muy pequeña (inferior al 10%), no tiene ningún sentido práctico su búsqueda [59,103].

El proyecto GAIT 2 es, como se ha visto con anterioridad, una ampliación del proyecto GAIT 1 y presenta 935 individuos agrupados en 35 familias de población española (Tabla 1.5). Cada familia tiene un mínimo de 10 miembros y 3 generaciones y ha sido reclutado a partir de un paciente con trombofilia idiopática [101,102].

Tabla 1.5: Descripción del proyecto GAIT 2¹.

Características	
Individuos totales	935
Edades (min:max)	2-101
Sexo (M:F)	465:470
Familias	35
Parejas de parentesco	8649
Individuos con trombosis	120
Individuos con trombosis venosa	86
Individuos con trombosis arterial	47
Individuos con ambas trombosis	13
Parámetros plaquetarios analizados	11

¹ Tabla elaborada en base al estudio previamente publicado [102].

6.2. Proyecto RETROVE

El proyecto RETROVE (Riesgo de Enfermedad TROmboembólica Venosa) ha sido diseñado y realizado por la Unitat d'Hemostàsia i Trombosi del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (2012–2016) en colaboración con la Unitat de Genòmica i Malalties Complexes de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Sant Pau (IIB–Sant Pau).

Los objetivos principales de este proyecto son: la identificación de nuevos factores de riesgo de VTE y la formulación de un algoritmo matemático de predicción de riesgo individual de VTE, mediante la combinación ponderada de diferentes factores (plasmáticos, genéticos y epigenéticos).

El proyecto RETROVE es un estudio prospectivo caso–control de 400 pacientes mayores de 18 años con VTE, según el criterio clínico definido de inclusión, y 400 controles, según la distribución de edad y sexo de la pirámide poblacional española en el censo del 2001 (Tabla 1.6).

Tabla 1.6: Descripción del proyecto RETROVE.

Características	
Individuos totales (caso:control)	400:400
Edades (min:max)	19–96
Sexo (M:F)	390:410
Total de trombosis	513
Trombosis venosas	504
Trombosis arteriales	9
Eventos trombotico de inclusión al proyecto	400
Individuos con 1 evento trombotico	310
Individuos con 2 evento tromboticos	72
Individuos con 3 evento tromboticos	15
Individuos con 4 evento tromboticos	3

7. Metodología de laboratorio

El recuento, volumen e inmadurez plaquetarios son sencillos de evaluar con la tecnología existente [49,52,79,104]. Sin embargo, la función plaquetaria puede ser evaluada mediante determinaciones *in vivo* o *in vitro* [95,105]. Uno de los métodos más usados para explorar la función plaquetaria es la obtención del CT gracias al analizador PFA-100® (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburgo, Alemania) para dos agonistas (ADP y epinefrina) [106]. Por su parte, la agregación plaquetaria puede ser valorada mediante la agregación en sangre total o Multiplate™ (Roche Diagnostics Internacional, Basilea, Suiza), con la que se pueden explorar mayor cantidad de agonistas aunque no explora la adhesión [44,105].

7.1. Determinación del recuento e índices de plaquetas y de la fracción plaquetaria inmadura

Los analizadores hematológicos automáticos obtienen recuentos de plaquetas de manera rápida y sencilla, además de otros parámetros o índices plaquetarios. Asimismo, determinan la subpoblación de plaquetas inmaduras [39,52,53]. Los analizadores hematológicos automáticos Sysmex® (Roche Diagnostics Internacional, Basilea, Suiza) siguen los principios de impedancia (Sysmex XE-2100® y Sysmex KX-21N®) y dispersión óptica (Sysmex XE-2100®).

El principio de impedancia fue descrito por el ingeniero americano Wallace Coulter (1913–1998) en el año 1956 y consiste en la circulación de las células, suspendidas en un líquido conductor, por una abertura por la que pasa una corriente eléctrica constante. Así el aumento transitorio en la impedancia es proporcional al volumen de la célula que lo atraviesa [39,50].

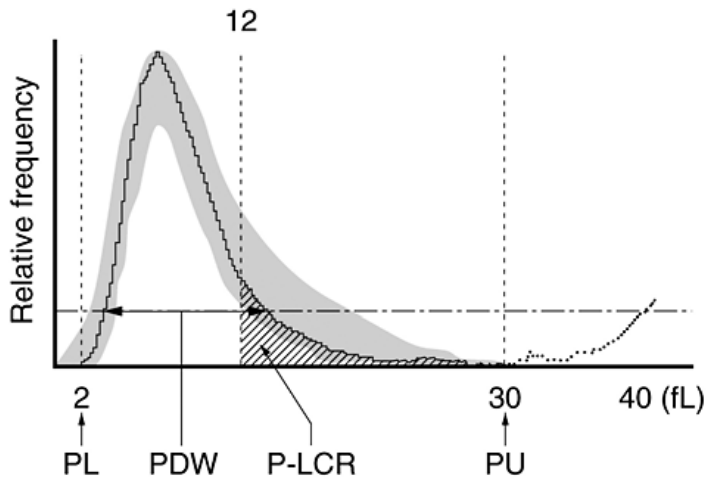


Figura 1.9: Distribución log-normal de la población de plaquetas. Las abreviaturas que aparecen en el gráfico de izquierda a derecha indican: PL como límite inferior de detección (2 fL), PDW como amplitud de distribución de volúmenes plaquetarios o *platelet distribution width*, P-LCR como índice de plaquetas de volumen superior en 12 fL o *platelet-large cell ratio*, PU como límite superior de detección (30 fL). Imagen tomada de una publicación previa [50]. Texto adaptado de dos publicaciones previas [49,50].

El segundo principio se basa en la difracción óptica en la cual la trayectoria de un rayo láser incide en cada una de las células. El análisis de la luz difractada permite estimar el volumen de las células y su complejidad interna. Así, la población celular sanguínea de mayor volumen y menor complejidad se podrá identificar con los hematíes mientras que la población de menor tamaño y mayor complejidad se identificará con las plaquetas (Figura 1.9) [39,50].

Los recuentos y volúmenes plaquetarios obtenidos mediante el analizador hematológico Sysmex XE-2100® son: recuento estándar de plaquetas (PLT) y recuento óptico de plaquetas (PLTOP). También se han obtenido los siguientes índices plaquetarios: volumen plaquetario medio (MPV), amplitud de la distribución de los volúmenes plaquetarios (PDW), índice de plaquetas de volumen

superior a 12 fL (P-LCR) y plaquetocrito o masa plaquetaria (PCT) (Tabla 1.7a).

El analizador hematológico Sysmex KX-21N[®] también funciona con el principio de impedancia pero tiene la particularidad permitir seleccionar el umbral superior de los volúmenes plaquetarios a 40 fL, minimizando la infravaloración de las plaquetas de mayor volumen. Los parámetros obtenidos con este analizador son: recuento de

Tabla 1.7a: Parámetros plaquetarios (I) evaluados en los diferentes estudios expuestos en el trabajo¹.

Sysmex XE-2100[®] (impedancia)		
PLT	×10 ⁹ /L	Recuento de plaquetas.
MPV	fL	Volumen plaquetario medio.
PDW	%	Distribución de los volúmenes plaquetarios.
PCT	%	Plaquetocrito.
Sysmex KX-21N[®] (impedancia)		
PLT40	×10 ⁹ /L	Recuento de plaquetas con un umbral superior de detección de 40 fL
MPV40	fL	Volumen plaquetario medio con un umbral superior de detección de 40 fL.
PCT	%	Plaquetocrito calculado con MPV 40fL.
Sysmex XE-2100[®] (difracción óptica)		
PLTOP	×10 ⁹ /L	Recuento de plaquetas óptico.
P-LCR	%	Índice de plaquetas de volumen superior a 12 fL.
IPF%	%	Porcentaje de plaquetas inmaduras.
HIPF%	%	Porcentaje de plaquetas inmaduras con mayor contenido de RNA dentro de IPF%.
IPF#	×10 ⁹ /L	Recuento de IPF absoluto.
IPF-X	uf	Media de RNA contenido por plaqueta en unidades de fluorescencia.

¹ De izquierda a derecha: abreviatura del parámetro plaquetario evaluado, unidades de medición y descripción.

plaquetas (PLT40), volumen plaquetario medio (MPV40) y plaquetocrito (PCT40) (Tabla 1.7a).

Los parámetros de IPF se han obtenido mediante el canal de difracción óptica del Sysmex XE-2100[®] previa tinción automática de la muestra con un colorante específico para RNA (véase apartado 4) (Tabla 1.7a). Los parámetros de IPF obtenidos son: porcentaje de plaquetas inmaduras (IPF%), porcentaje de plaquetas inmaduras con mayor contenido de RNA dentro de IPF% (HIPF%), recuento de IPF absoluto (IPF#) y media del contenido de RNA contenido por la plaqueta (IPF-X)

7.2. Determinación de función plaquetaria global

El analizador de la función plaquetaria PFA-100[®] utiliza un método basado en las propiedades adhesivas y agregantes de las plaquetas a índices elevados de cizallamiento ($5\ 000\text{--}6\ 000\ \text{s}^{-1}$), en presencia del agonista expuesto [105,106]. El ensayo de función plaquetaria (PFA) es, por tanto, una técnica *in vitro* reproducible realizada a partir de sangre total citratada [95,106]. La muestra de sangre es aspirada de manera constante hacia una membrana impregnada de colágeno que contiene una apertura de $\sim 150\ \mu\text{m}$ de diámetro. Además del colágeno la membrana contiene ADP (cartucho de colágeno-ADP) o epinefrina (cartucho de colágeno-epinefrina). Pasado un determinado tiempo, la adhesión y agregación de las plaquetas obturan el orificio [105,107]. El tiempo de obturación del orificio o CT, medido en segundos, es inversamente proporcional a la capacidad funcional de las plaquetas y, por tanto, de gran utilidad diagnóstica.

En la actualidad, la principal aplicación del analizador PFA-100[®] e la clínica es el diagnóstico de los déficits de la hemostasia primaria, como trombocitopatías y enfermedad de von Willebrand, también es una herramienta útil para el seguimiento del tratamiento antiagregante [95,96,105,107]. Recientemente, se han publicado estudios centrados

en la detección de incrementos de la función plaquetaria o hiperreactividad plaquetaria en relación con la trombosis arterial [98,100]. Sin embargo, una revisión reciente de Emmanuel Favalaro, basada en el análisis de numerosos estudios en enfermedad cardiovascular, sugirió que los CT cortos pudieran reflejar una tendencia protrombótica [46,98–100].

Con el analizador PFA-100[®] se obtienen dos parámetros: CT del cartucho de colágeno-ADP (PFAadp) y CT del cartucho de colágeno-epinefrina (PFAepi), ambos en segundos (Tabla 1.7b).

7.3. Determinación de la agregación plaquetaria

La agregometría en sangre total por impedancia o Multiplate[™] es un método que permite valorar la agregación plaquetaria a través de la variación de la impedancia entre dos electrodos sumergidos en la muestra de sangre citratada en agitación y temperatura constante (37 °C) [44]. Cuando los electrodos entran en contacto con la sangre se genera una capa de plaquetas. La introducción de un agonista genera que la conductancia disminuya con rapidez. Por el contrario, la impedancia aumenta en función del número de plaquetas acumulado en los electrodos [44,105]. Mientras que a baja concentración de agonista se obtienen curvas reversibles, a elevadas concentraciones se consigue una agregación irreversible [44]. En el presente trabajo de tesis se ha valorado un único tipo de agonista, el ADP, a concentraciones de 0,25 μM y 0,5 μM .

En este caso los parámetros obtenidos con el Multiplate[™] son: área bajo la curva (AUC), agregación en porcentaje (AGR) y pendiente de la curva en unidades de absorbancia por minuto (SLP) (Tabla 1.7b).

Tabla 1.7b: Parámetros plaquetarios (II) evaluados en los diferentes estudios expuestos en el trabajo¹.

PFA-100®		
PFAadp	s	Tiempo de obturación del cartucho colágeno-ADP.
PFAepi	s	Tiempo de obturación del cartucho colágeno-epinefrina.
Multiplate™		
ABC ^a	UA ^b	Área bajo la curva.
AGR ^a	%	Agregación.
SLP ^a	UA · min ⁻¹	Pendiente de la curva.

¹ De izquierda a derecha: abreviatura del parámetro plaquetario evaluado, unidades de medición y descripción.

^a Parámetros del Multiplate™ obtenidos en respuesta a baja (0,25 μM) y alta (0,5 μM) concentraciones de ADP como agonista.

^b Unidades de absorbancia (UA).

8. Metodología estadística

Los resultados de un análisis descriptivo conducen a la generación de hipótesis científicas que son confirmadas o refutadas, con las herramientas estadísticas apropiadas. Una de las herramientas más utilizadas en la estadística inferencial es el análisis de regresión usado en diversos campos de la epidemiología genética y la evaluación de riesgos.

8.1. Análisis de la regresión

El concepto de regresión fue introducido en el año 1889 por el estadístico y matemático inglés Sir Francis Galton (1822–1911) [108]. El análisis de la regresión es un modelo matemático que permite estimar las relaciones entre la variable dependiente y la variable independiente. Un modelo de regresión tipo, según su fórmula escalar, se define como

$$y_i = \beta_0 + \sum \beta_i \cdot x_i + \varepsilon,$$

donde y es la variable variable respuesta(o dependiente), β_0 es la raíz de la función o *intercept* de y , β_i es el coeficiente de regresión, también denominado pendiente o *slope*, asociado a la variable explicativa x_i (o independiente), y ε es el error aleatorio [109].

Los análisis de regresión persiguen principalmente tres finalidades. En primer lugar, establecer una relación causal entre la variable dependiente y la variable independiente. En segundo lugar, predecir los valores futuros que toma la variable respuesta en función de la variable independiente. Por último, caracterizar las variables independientes, mostrando cuál de ellas tiene una mayor importancia para explicar el comportamiento de la variable dependiente. Así el modelo final facilita la comprensión del comportamiento de la variable dependiente en función del tipo de relación e importancia de las variables independientes [109,110].

Existen diferentes tipos de modelos de regresión dependiendo del número de variables independientes (regresión simple o múltiple), así como del tipo de función utilizada (lineal o no lineal). En este trabajo centramos nuestro interés en la combinación de dos de estos tipos de regresión: la regresión lineal múltiple.

Mientras una regresión lineal simple permite trabajar con una sola variable, es posible analizar la relación entre dos o más variables en un mismo modelo de regresión, lo que se denomina regresión lineal múltiple o regresión lineal multivariante [111]. Así su fórmula escalar, se define como

$$y_i = \beta_0 + \sum \beta_i \cdot x_{ij} + \varepsilon_{ij},$$

donde y_i es la variable dependiente, $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ son los coeficientes de regresión, y ε_i es el error aleatorio asociado a la variable y_i , asumiendo la independencia de la variable ($E(\varepsilon_i) = 0$), y la varianza constante ($\text{Var}(\varepsilon_i) = \sigma^2$) para $i = 1, 2, \dots, n$. En un ejemplo clásico de regresión lineal se asume una distribución normal en la que la varianza σ^2 es constante. Siendo ciertas estas asunciones, los coeficientes de regresión pueden ser estimados mediante el principio de los mínimos cuadrados, formulada en el teorema de Gauss–Márkov (1829) [111].

8.1.1. Modelos lineales mixtos

La aplicación de un modelo de regresión lineal queda sujeta al cumplimiento de las asunciones anteriormente citadas, siendo el de la independencia de las variables imprescindible para su aplicación. Este supuesto implica que los residuos (ε_{ij}) de las variables independientes no se encuentren correlacionados. Es precisamente en este punto, donde los modelos de regresión lineal mixto o *linear mixed models* (LMM) se muestran como una excelente solución al contemplar la varianza debida a dos tipos diferentes de efectos: fijos (*fixed effects*) y aleatorios (*random effects*). Así los efectos fijos influyen altamente y

de manera persistente en la varianza. Por su parte, los efectos aleatorios, introducidos por primera vez en un modelo lineal por el biólogo y estadístico inglés Sir Ronald Fisher (1890–1962), contemplan la influencia dispar de la varianza en la variable dependiente [112]. Los LMM quedan formulados de la siguiente manera:

$$y_i = \beta_0 + \sum \beta_j \cdot x_{ij} + \sum u_{ij} + \gamma_i + \varepsilon_j,$$

donde u_{ij} son las covariables con efectos aleatorios y γ_i sus correspondientes coeficientes. Los modelos mixtos son especialmente útiles para analizar datos que tienen una cierta estructura intrínseca en distintos niveles (clases o *clusters*).

Una aplicación práctica de éstos ha permitido evaluar la influencia de la edad y el sexo sobre los parámetros plaquetarios en una población sana extraída del estudio GAIT 2. Los dos tipos de efectos contemplados en los LMM permiten el análisis de covariables como la edad y sexo, como efectos fijos, y a su vez, modelizar la matriz de relación entre los individuos de una misma familia, como efecto aleatorio [113].

8.1.2. Modelos lineales generalizados

Los modelos lineales generalizados o *generalized linear models* (GLM) derivan del no cumplimiento de la normalidad, la varianza no constante o la no linealidad de las observaciones. Este tipo de modelización lineal fue formulada por los estadísticos John Nelder (1924–2010) y Robert Wedderburn (1947–1975). El GLM muestra tres componente principales: sistemática (o predictor lineal) y aleatoria (observaciones independientes generalmente variables de distribución binomial) y función ligando o *link*. Este último componente permite relacionar los valores esperados de la componente aleatoria como combinación lineal de las variables predictoras (generalmente *logit* para distribución binomial) [114,115].

Así los GLM se han postulado como una herramienta útil para el cálculo de riesgo en un rasgo cuantitativo en respuesta a una variable discreta y dicotómica que registra el estado de la enfermedad como afecto o sano. La conversión del rasgo cuantitativo en rasgo discreto y dicotómico permite definir un umbral determinado de riesgo o *liability* (percentil 90 de los individuos sanos). De este modo, si el valor de riesgo de un individuo sobrepasa el valor umbral determinado, se le presupone una predisposición a la enfermedad (riesgo) mientras que, si este valor no supera el umbral, el individuo no manifestará la enfermedad (normal). Además, los GLM permiten la introducción de diferentes variables confusoras (*confounders*) que evalúan la posible relación de nuestro rasgo cuantitativo o de riesgo y la enfermedad, en nuestro caso la VTE.

8.2. Entorno R

La totalidad de los análisis estadísticos de este trabajo se han realizado en R. Diseñado en 1993 por George Ihaka y Robert Gentleman, de la Universidad de Auckland (Nueva Zelanda), R es un entorno y lenguaje libre de programación focalizado en el análisis estadístico [116]. Se trata de una evolución del lenguaje S y su característica más importante es la capacidad de incluir paquetes (o *packages*), creados por los propios usuarios, y que permiten hacer frente a problemas estadísticos, mediante la creación de funciones y algoritmos. La totalidad de los análisis estadísticos se han realizado en el entorno estadístico R, usando los *packages* adecuados para cada trabajo como *lme4* o *lmerTest* [117,118]. Además, durante la realización del presente trabajo, nuestro grupo, también se ha participado activamente en el desarrollo de algunos de ellos [119,120].

Capítulo 2

Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis

⇒ Los analizadores hematológicos tienden a infravalorar las plaquetas ligeramente aumentadas de tamaño, generando mediciones erróneas en los recuentos y volúmenes plaquetarios.

Hipótesis 1: *Es posible mejorar la medición de los recuentos y volúmenes, así como los plaquetocritos, incorporando un analizador hematológico que valore mejor las plaquetas de un mayor volumen.*

⇒ Es bien conocido que existen diferencias en las mediciones de los recuentos e índices plaquetarios de la población general debidas a la edad y/o el sexo. Sin embargo, en la población caucásica española no se han establecido estándares de normalidad para la población infantil y adolescente

Hipótesis 2: *Es posible obtener estándares de normalidad de los parámetros plaquetarios según los grupos los de edad y/o sexo en la población sana, adulta e infantil, del proyecto GAIT 2, a condición de aplicar métodos estadísticos apropiados que eliminen el efecto del parentesco.*

⇒ La variación de los fenotipos cuantitativos plaquetarios tiene una cierta correlación con la información genética. Estas variaciones pueden modificar el equilibrio hemostático primario, así como influir en el riesgo de VTE.

Hipótesis 3: *La determinación genética de los fenotipos cuantitativos plaquetarios analizados en el marco del proyecto GAIT 2 puede contribuir a la detección de nuevos factores genéticos de riesgo de VTE.*

⇒ La determinación de los intervalos de normalidad en la población sana del proyecto GAIT 2, así como la estandarización de la metodología de obtención de las

mediciones de los parámetros plaquetarios, ha permitido incluirlos como biomarcadores de riesgo de VTE en el estudio RETROVE.

Hipótesis 4: *Las variaciones de los parámetros plaquetarios (recuentos, índices y función), que comportan un desequilibrio en el sistema hemostático, se asocian a un aumento del riesgo de VTE.*

2. Objetivos

- ⇒ Evaluar las diferencias en las mediciones de recuento, volumen y plaquetocrito obtenidas a través de un analizador hematológico estándar y un analizador hematológico que mejore la medición de las plaquetas con mayor volumen (Estudio #1).
- ⇒ Dado que la población sana del proyecto GAIT 2 puede mostrar una relación de parentesco, desarrollar un modelo estadístico apropiado que neutralice el posible efecto del parentesco y permita evaluar el influencia de la edad y/o sexo para cada uno de los parámetros plaquetarios analizados (Estudio #1).
- ⇒ Establecer los estándares de normalidad para cada uno de los parámetros plaquetarios obtenidos en el estudio GAIT 2 según grupos de población de edad –infantil, adolescente, adulta y anciana– y/o sexo (Estudio #1).
- ⇒ Estimar los determinantes genéticos de algunos fenotipos plaquetarios previamente estudiados: recuento de plaquetas, volumen plaquetario medio, amplitud de distribución de los volúmenes plaquetarios y plaquetocrito (Estudio #2)
- ⇒ Estimar, por primera vez, los determinantes genéticos de algunos fenotipos plaquetarios: índice de plaquetas de volumen superior a 12 fL, fenotipos de la fracción plaquetaria inmadura y fenotipos de función plaquetaria obtenidos con el analizador PFA-100® (Estudio #2).
- ⇒ Analizar y estimar el riesgo de VTE asociado al aumento de algunos valores de los recuentos e índices plaquetarios en la población del estudio RETROVE (Estudio #3).

⇒ Analizar y estimar el riesgo de VTE asociado a la obtención de tiempos de obturación cortos en el analizador PFA-100®, indicadores de un aumento de función plaquetaria, en la población del proyecto RETROVE (Estudio #4).

Capítulo 3

Estudios aportados

Estudio #1

Vázquez-Santiago, M., Ziyatdinov, A., Pujol-Moix, N., Brunel, H., Morera, A., Soria, J. M., Souto, J. C. (2016). Age and gender effects on 15 platelet phenotypes in a Spanish population. *Computers in Biology and Medicine*, 69, 226–233.

Artículo y resultados suplementarios

Estudio #2

Pujol-Moix, N., Vázquez-Santiago, M., Morera, A., Ziyatdinov, A., Remacha, A., Nomdedeu, J. F., Fontcuberta, J., Soria, J.M., Souto, J. C. (2015). Genetic determinants of Platelet Large-Cell Ratio, Immature Platelet Fraction, and other platelet-related phenotypes. *Thrombosis Research*, 136(2), 361–366.

Artículo y resultados suplementarios

Estudio #3

Platelet Count and Plateletcrit are Associated with an Increased Risk of Venous Thrombosis in Females. Results from the RETROVE Study.

Artículo sometido a *Thrombosis Research*

Estudio #4

Short Closure Time Values Evidenced with PFA-100® Methodology are Related with Thrombotic Risk. Results from the RETROVE Study.

Manuscrito en proceso

Estudio #1

Age and gender effects on 15 platelet phenotypes
in a Spanish population



Age and gender effects on 15 platelet phenotypes in a Spanish population

Miquel Vázquez-Santiago^a, Andrey Ziyatdinov^b, Núria Pujol-Moix^{a,c}, Helena Brunel^b, Agnès Morera^a, José Manuel Soria^b, Juan Carlos Souto^{a,*}

^a Unitat d'hemostàsia i Trombosi, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret, 167, Barcelona 08025, Spain

^b Unit of Genomics of Complex Diseases, Sant Pau Institute of Biomedical Research (IIB-Sant Pau), Sant Antoni Maria Claret, 167, Barcelona 08025, Spain

^c Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret, 167, Barcelona 08025, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2015

Accepted 26 December 2015

Keywords:

Age
Gender
Immature platelet fraction (IPF)
Platelet counts
Platelet indices
Platelet function assay (PFA)

ABSTRACT

Introduction: Several studies have analysed the platelet parameters in human blood, nevertheless there are no extensive analyses on the less common platelet phenotypes. The main objective of our study is to evaluate the age and gender effects on 15 platelet phenotypes.

Methods: We studied 804 individuals, ranging in age from 2 to 93 years, included in the Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia 2 (GAIT 2) Project. The 15 platelet phenotypes analysed were the platelets counts, platelet volumes, plateletcrits, immature platelet fraction (IPF) and platelet function assay (PFA). A regression-based method was used to evaluate the age and gender effects on these phenotypes.

Results: Our results were consistent with the previously reported results regarding platelet counts and plateletcrit (PCT). They showed a decrease with increasing age. The mean platelet volume (MPV), platelet distribution width (PDW) and platelet-large cell ratio (P-LCR) increased with age, but did not present any gender effect. All the IPF phenotypes increased with age, whereas the PFA phenotypes did not show any relation to age or gender.

Discussion: To sum up, our study provides a comprehensive analysis of the age and gender effects on the platelet phenotypes in a family-base sample. Our results suggest more reasonable age stratification into two distinct groups: childhood, ranging from 2 to 12 years, and the mature group, from 13 to 93 years. Moreover, the PFA phenotypes were maintained constant while the platelet counts, the MPV and IPF levels vary with age.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Platelets are anucleated blood cells that play an important role in different physiological functions such as haemostasis, wound healing and inflammation [1,2]. Their intrinsic features include size, metabolic capacity, ability to aggregate and relative short lifespan (8–10 days). These features determine their functional properties [3,4]. Megakaryocytes maintain the platelet population and functionality, producing about 10^{11} platelets per day [4,5].

The haematological status of individuals is currently based on the assessment of different clinical phenotypes such as platelet counts, platelet volumes and plateletcrits [6–8]. These phenotypes are used to determine the thrombopoietic status of patients and

quantitative variations in platelet phenotypes [9–11]. The platelet distribution width (PDW) describes how uniform the platelets are in size, and it has been proposed as a marker of platelet activation [7,12]. The platelet-large cell ratio (P-LCR) is defined as the percentage of large platelet volume, and it has been associated with higher platelet reactivity and cardiovascular risk [13–15]. The immature platelet fraction (IPF) phenotypes are an indirect measurement of the reticulated platelets and the thrombopoiesis turnover [7,9,16,17]. The platelet function assay (PFA) phenotypes estimate the platelet function [18,19]. All of these platelet phenotypes are measured using either haematological analysers [6,8,9] or *in vitro* assays [19–21].

In the healthy human population, normal platelet counts range from 150 to $400 \cdot 10^9/L$ of whole blood [4,5,22]. The mean platelet volume (MPV) ranges from 7.8 to 11.0 fL [23] and the reference PDW values range from 2 to 30 fL [11]. The IPF values range from 0.70% to 6.1% or 8% [6,7,24]. These phenotypes have previously been studied with respect to the effects of age and gender [25–27].

* Corresponding author. Tel.: +34 9335537151; fax: +34 9335537153.

E-mail addresses: MVazquezS@santpau.cat (M. Vázquez-Santiago), AZiyatdinov@santpau.cat (A. Ziyatdinov), NPujol@santpau.cat (N. Pujol-Moix), helena.brunel@gmail.com (H. Brunel), ambnesi@gmail.com (A. Morera), JSoria@santpau.cat (J.M. Soria), JSouto@santpau.cat (J.C. Souto).

Some studies have compared also many different haematological analysers [8,9,24,28], intervals of age [25,29,30], and the ethnicity or habitat [31–35]. There are also studies that have reported incomplete or partial analyses of the platelet blood count (PBC) [16,23,25].

The main aim of our study is to provide a comprehensive analysis of the influence of age and gender on 15 platelet phenotypes. An underlying aim is to determine statistical differences among the results obtained using two different automated haematological analysers on these 15 platelet phenotypes and, finally, our third aim was to develop a single statistical model to evaluate the age and gender effects on each these phenotypes.

2. Methods

2.1. Sample

We studied a subset population of the GAIT 2 Project at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau of Barcelona, Spain. The main aim of the GAIT 2 Project was to identify genetic factors of thrombophilia using family-based analyses and variance component statistical methods [36]. The GAIT 2 population consisted of

935 individuals from 35 extended Spanish families. Each family consisted of at least 10 members over 3 generations and was ascertained through a proband with idiopathic thrombophilia.

To be included in the present study, an individual had to present normal haematological values, including normal iron metabolism. The exclusion criteria were any venous or arterial thrombosis event (previous or present), apparent illness, signs or symptoms of acute illness, inflammatory or infectious disease in the last four weeks, active malignancy and antiaggregant drugs intake in the last two weeks before onset of the study. Individuals with haemorrhagic diathesis also were excluded of the study. Thus, the total analysed population consisted of 804 healthy Caucasian individuals and 131 individuals were excluded. The ages of our population ranged from 2 to 93 years and it included 389 males and 415 females, who were divided into the following four age groups: childhood (Group 1), adolescence (Group 2), adulthood (Group 3) and elders (Group 4), as listed in Table 1.

Our study complied with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all adult patients and by parents of children. All procedures were approved by the Institutional Review Board at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Table 1

Age groups in the GAIT2 subset population included in the study.

Groups (years)	Males		Females		Total	
	N	Age ± SD ^a	N	Age ± SD ^a	N	Age ± SD ^a
Childhood group 1 (2–12 years)	66	7.8 ± 2.9	59	8.8 ± 2.7	125	8.3 ± 2.8
Adolescence group 2 (13–18 years)	42	16.1 ± 1.7	25	15.9 ± 1.8	67	16.0 ± 1.7
Adulthood group 3 (19–64 years)	243	41.9 ± 11.8	269	41.1 ± 11.6	512	41.5 ± 11.7
Elders group 4 (65–93 years)	38	74.0 ± 6.7	62	74.4 ± 6.6	100	74.3 ± 6.6
Total (2–93 years)	389	36.5 ± 20.9	415	40.0 ± 21.1	804	38.3 ± 21.1

^a Means and standard deviations (SD) are given in years.

Table 2

Platelet phenotypes analysed in our study by automated haematological analyser and methodology.

Phenotype groups	Sysmex XE-2100 [®]		Sysmex KX-21N [®]	PFA-100 [®]
	Impedance	Optical	Impedance	In vitro
Platelet counts	PLT	PLTOP	PLT40	
Platelet volumes	MPV PDW	P-LCR	MPV40	
Plateletcrits	PCT		PCT40	
Immature platelet fraction	IPF%		HIPF%	
Platelet function assay	IPF#		IPF-X	PFAadp PFAepi

Table 3

Pairwise comparison of phenotypes measured by different automated haematological analysers and/or methodology using the *Sign test*.

Phenotype groups	Sysmex XE-2100 [®]		Sysmex KX-21N [®]		p-values
	Impedance	Optical	Impedance		
Platelet counts ^a	PLT	232 (240 ± 55)	PLTOP	230 (237 ± 55)	3.1 · 10 ⁻³
	PLT	232 (240 ± 55)		230 (237 ± 55)	1.76 · 10 ⁻¹³
Platelet volumes	MPV	11.0 (10.5 ± 1.5)	MPV40	12.1 (12.3 ± 1.5)	< 2.2 · 10 ⁻¹⁶
	Plateletcrit ^b	PCT		0.25 (0.25 ± 0.05)	0.28 (0.30 ± 0.08)

Platelet counts, volumes and plateletcrits show the median (mean ± standard deviation). (*) Median and mean in platelet volumes (MPV and MPV0) are given in fL.

^a Median and mean in platelet counts (PLT, PLTOP and PLT40) are given in × 10⁹/L.

^b Median and mean in plateletcrit (PCT and PCT40) are given in percentage (%).

Table 4
Means and confidence intervals of platelet counts, mean platelet volumes and plateletcrits phenotypes.

	Gender ^a	PLT ($\times 10^9/l$) ^b	PLT0P ($\times 10^9/l$) ^b	PLT40 ($\times 10^9/l$) ^b	PCT (%) ^c	PCT40 (%) ^c	MPV (fL) ^b	MPV40 (fL) ^b	PDW (%) ^b	P-LCR (%) ^b
Group 1	M	323 (310–337)	319 (305–333)	365 (350–380)	0.31 (0.30–0.32)	0.46 (0.44–0.47)	9.5 (9.2–9.7)	12.7 (12.4–13.0)	10.9 (10.5–10.3)	21.6 (19.8–23.4)
	F	319 (304–335)	315 (298–331)	360 (343.02–377.22)	0.31 (0.29–0.32)	0.31 (0.29–0.32)	10.4 (10.1–10.7)	12.5 (12.1–13.0)	12.7 (12.2–13.2)	29.3 (27.2–31.3)
Group 2	M	224 (208–240)	223 (205.38–241)	241 (224–259)	0.23 (0.22–0.25)	0.31 (0.29–0.33)	10.6 (10.5–10.7)	12.2 (12.05–12.35)	13.1 (12.9–13.3)	31.1 (30.4–31.8)
	F	253 (233–272)	255 (234–276)	258 (236–279)	0.27 (0.25–0.29)	0.29 (0.28–0.29)	10.9 (10.6–11.3)	12.3 (11.1–12.5)	13.5 (13.0–14.0)	32.9 (30.9–35.0)
Group 3	M	218 (212–224)	217 (210–223)	222 (215–229)	0.23 (0.23–0.24)	0.27 (0.26–0.27)	10.9 (10.6–11.3)	12.3 (11.1–12.5)	13.5 (13.0–14.0)	32.9 (30.9–35.0)
	F	248 (242–253)	243 (237–249)	247 (241–254)	0.26 (0.26–0.27)	0.27 (0.26–0.27)	10.9 (10.6–11.3)	12.3 (11.1–12.5)	13.5 (13.0–14.0)	32.9 (30.9–35.0)
Group 4	M	202 (193–211)	197 (178–216)	207 (187–228)	0.22 (0.20–0.24)	0.27 (0.25–0.29)	10.9 (10.6–11.3)	12.3 (11.1–12.5)	13.5 (13.0–14.0)	32.9 (30.9–35.0)
	F	231 (215–247)	221 (204–237)	224 (206–241)	0.25 (0.24–0.27)	0.27 (0.25–0.29)	10.9 (10.6–11.3)	12.3 (11.1–12.5)	13.5 (13.0–14.0)	32.9 (30.9–35.0)

Confidence interval (between brackets) was fixed in 95%.

^a Males (M) and females (F).

^b Phenotypes obtained by the Sysmex XE-2100[®].

^c Phenotypes obtained by the Sysmex KX-21N[®].

2.2. Blood collection

To minimise the circadian fluctuation, all of the blood samples were obtained by venipuncture between 9:00 a.m. and 9:30 a.m., under basal conditions after 12-h overnight fasting. A 5 ml sample was obtained in anti-coagulant EDTA-K3 to determine platelet counts, platelet volumes, and IPF phenotypes. Another 5 ml sample was obtained in citrate to determine PFA phenotypes. Both samples were processed within 2–4 h of collection.

2.3. Measure of phenotypes

We used two automated haematological analysers: Sysmex XE-2100[®] and KX-21N[®] (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), to measure 13 of the 15 phenotypes. Two of the phenotypes were determined using the PFA-100[®] system (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany). All the 15 platelet phenotypes are shown in Table 2.

The platelet counts (PLT and PLTOP), platelet volumes (MPV, P-LCR and PDW) and plateletcrit (PCT) were determined by Sysmex XE-2100[®], whereas the Sysmex KX-21N[®] was used to obtain additional measures of platelet count and platelet volume (PLT40 and MPV40), fixing the upper threshold of the platelet population at 40 fL. The plateletcrit (PCT40) was calculated as follow: $MPV40 \cdot PLT40/1000$. The IPF phenotypes were also determined with the Sysmex XE-2100[®] using the optical technology. These IPF phenotypes were: (1) percentage of the immature platelets (IPF%), (2) percentage of the IPF with the highest RNA content included the IPF% (HIPF%), (3) absolute count of IPF (IPF#) and (4) mean RNA content per platelet (IPF-X). The two PFA phenotypes were measured using the PFA-100[®] system, shown in Table 2. This system measures the platelet function by simulating a vessel wall under shear stress in *in vitro* conditions. The Closure Time (CT) was measured using two different cartridge membranes, collagen-ADP (PFAadp) and collagen-epinephrine (PFAepi), according to the instructions of the manufacturers.

2.4. Statistical analysis

Since we used two different analysers to measure platelet counts (PLT, PLTOP and PLT40), mean platelet volumes (MPV and MPV40) and plateletcrits (PCT and PCT40), we applied a non-parametric *Sign test* to compare the measurements from two different automated haematological analysers (Sysmex XE-2100[®] and Sysmex KX-21N[®]) and channels (impedance and optical). The *Sign test* compares the medians with the null hypothesis of non-differences in the medians between measurements.

To evaluate the effects of age and gender on the 15 phenotypes under study, we used a linear regression model with three covariates: the categorical four age groups, the continuous age and the gender. The categorical age variable allowed for a more clinically relevant interpretation of the phenotypes means and confidence intervals (CI) per age group, while the continuous age variable was used to take into account the dynamics of the phenotype value within the group, especially in the case of the group of children under the age of 13 years old. We also considered possible interactions between the age group and the other two covariates. To explicitly account for the non-independence among individuals in our family-based sample, we applied a linear mixed effects (LME) model. Each phenotype y is denoted in vector notation as following:

$$y = X\beta + g + \epsilon,$$

where X is a matrix of fixed effects or covariates, β are the regression coefficients or effect sizes, g is a vector of the random genetic effects and ϵ is the residual error. The term g is assumed to

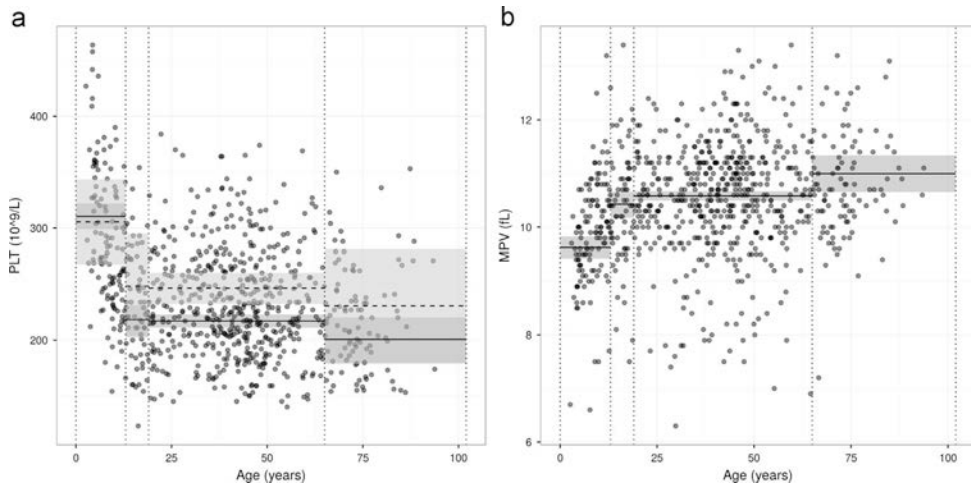


Fig. 1. Mean values per age group in PLT and MPV phenotypes. (a) The mean in PLT ($\times 10^9/L$) was divided by male (solid line and dark grey) and female (broken line and light grey) along the age. (b) The mean in MPV (fL) along the age without gender influence. The 95% confidence intervals for model parameters were estimated by the bootstrap method with 1000 iterations.

have a Gaussian distribution with zero mean and covariance matrix defined by the kinship matrix.

The R packages lme4 [37] and the lmerTest [38] were used to fit the LME model and test for the statistical significance of the effects, respectively. A backward elimination model-building strategy was used, discarding the non-significant covariates according to the principle of marginality (testing the highest order of interactions first). As random effects, we considered the genetic additive effect by means of the kinship matrix estimated by SOLAR [39]. The random effect of the 15 phenotype models was determined by the double kinship coefficient matrix based on the pedigree structure. That allowed to explicitly control the family-based relatedness among individuals.

3. Results

3.1. Platelets counts and plateletcrits phenotypes

The Sysmex XE-2100[®] measurements were compared to those of the Sysmex KX-21N[®], as shown in Table 3. The platelet counts (PLT, PLTOP and PLT40), the mean platelet volumes (MPV and MPV40), and the plateletcrit (PCT and PCT40) phenotypes were compared in pairs using the *Sign test*. For these phenotypes, the median values were higher with the Sysmex-KX-21N[®] than with the Sysmex XE-2100[®] instrument. For example, the PLT40 median (235) was higher than PLT median (232) with a p -value of $3.1 \cdot 10^{-3}$, as shown in Table 3.

The complete measurements for the platelet counts, platelet volumes and plateletcrits phenotypes are shown in Table 4. All of measurement of the platelet counts (PLT, PLTOP and PLT40) showed an age and gender effect, as the Group 1 presented higher significant values than Group 3 and Group 4. Also, PLT mean values in males were higher in Group 1 (323) than Group 3 (218) and Group 4 (202). The platelet counts showed higher values in females than in males, except for the Group 1. Namely in Group 3 for the PLT, the mean values in females (248) were higher than in males (218), as shown in Fig. 1a. Differences between Group 1 and Group 3, as well as Group 1 and Group 4, were statistically significant for all platelets counts (Table 5). For instance, PLT showed an estimated mean differences between Group 1 and Group 3 of

-89 ± 7 ($p < 2 \cdot 10^{-16}$), whereas between Group 1 and Group 4 was of 105 ± 10 ($p < 2 \cdot 10^{-16}$). Any statistical differences were observed between Group 2 and Group 3.

The plateletcrits values (PCT and PCT40) were significantly higher in females than in males, except in Group 1 (Table 4). For example, the mean PCT value in Group 3 was higher in females (0.26%) than males (0.23%). Also, we observed that the PCT and PCT40 values decreased with age. For instance, the mean PCT40 value in Group 1 (0.46%) was higher than Group 4 (0.27%). In addition, both plateletcrit phenotypes did not show any difference between Group 3 and Group 4.

3.2. Platelet volumes phenotypes

The remaining platelet phenotypes, MPV, MPV40, PDW and P-LCR, showed an age, but not a gender effect (Table 4). For the MPV, PDW and P-LCR values increased with age. For example, the MPV mean value in Group 1 (9.5 fL) was lower than in Group 4 (10.9 fL), as shown in Fig. 1b. Also, the PDW and P-LCR values increased with age (Table 4). These three phenotypes showed statistical differences between Group 1 and Group 3, as well as Group 1 and Group 4 (Table 5). For example, the MVP phenotype showed an estimated mean difference between Group 1 and Group 3 of 1.1 ± 0.1 fL ($p < 2 \cdot 10^{-16}$), whereas between the Group 1 and Group 4 was of -1.5 ± 0.2 fL ($p < 2 \cdot 10^{-16}$).

On the other hand, the MPV40 phenotype decreased with increasing age. The Group 1 value (12.7 fL) was higher than Group 4 (12.3 fL). In addition, this phenotype (MPV40) showed an estimated mean difference between Group 1 and Group 4 of 0.5 ± 0.2 fL ($p = 0.02$).

3.3. IPF and PFA phenotypes

The IPF and PFA measurements are shown in Table 6 and comparisons between groups in Table 7. The IPF values increased with the age. For instance, the mean IPF% value in Group 1 (1.92%) was lower than Group 3 (3.32%) and Group 4 (3.67%). Differences between Group 1 and Group 3, as well as between Group 1 and Group 4, were statistically significant for all IPF phenotypes. In addition, any statistical differences were observed between the Group 3 and Group 4 (Table 7).

Table 5
Estimated mean differences, standard errors (SE) and p-values (p-val) between age groups and gender for platelet counts, mean platelet volumes and plateletcrits phenotypes.

	PLT ($\times 10^9/L$) ^b		PLT ₁₀ ($\times 10^9/L$) ^c		PCT (%) ^b		PCT40 (%) ^c		MVP (fL) ^b		MVP40 (fL) ^c		PDW (%) ^b		P-LCR (fL) ^b	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Gr3-	-89 ± 7	< 2 · 10 ⁻¹⁶	-128 ± 7	< 2 · 10 ⁻¹⁶	-0.1 ± 0.01	< 2 · 10 ⁻¹⁶	-0.2 ± 0.01	< 2 · 10 ⁻¹⁶	1.1 ± 0.1	< 2 · 10 ⁻¹⁶	-0.5 ± 0.2	7 · 10 ⁻⁴	2.2 ± 0.2	< 2 · 10 ⁻¹⁶	9.5 ± 0.9	< 2 · 10 ⁻¹⁶
Gr1																
Gr3-	-6 ± 7	NS	-15 ± 8	NS	0.0 ± 0.01	NS	0.0 ± 0.01	0.008	0.2 ± 0.2	NS	-0.3 ± 0.2	NS	-0.4 ± 0.3	NS	1.8 ± 1.1	NS
Gr2																
Gr3-	16 ± 8	0.036	19 ± 8	0.022	0.0 ± 0.01	NS	0.0 ± 0.01	NS	-0.4 ± 0.2	0.017	0.0 ± 0.2	NS	-0.4 ± 0.3	NS	-1.8 ± 1.1	NS
Gr4																
Gr1-	83 ± 9	< 2 · 10 ⁻¹⁶	113 ± 10	< 2 · 10 ⁻¹⁶	0.1 ± 0.01	< 2 · 10 ⁻¹⁶	0.1 ± 0.01	< 2 · 10 ⁻¹⁶	-0.9 ± 0.2	< 2 · 10 ⁻¹⁶	0.2 ± 0.2	NS	-1.8 ± 0.3	< 2 · 10 ⁻¹⁶	-7.7 ± 1.1	< 2 · 10 ⁻¹⁶
Gr2																
Gr1-	105 ± 10	< 2 · 10 ⁻¹⁶	147 ± 10	< 2 · 10 ⁻¹⁶	0.1 ± 0.01	< 2 · 10 ⁻¹⁶	0.2 ± 0.01	< 2 · 10 ⁻¹⁶	-1.5 ± 0.2	< 2 · 10 ⁻¹⁶	0.5 ± 0.2	0.02	-2.6 ± 0.3	< 2 · 10 ⁻¹⁶	-11.3 ± 1.4	< 2 · 10 ⁻¹⁶
Gr4																
Gr2-	22 ± 10	0.032	34 ± 11	0.002	0.0 ± 0.01	NS	0.0 ± 0.01	0.002	-0.6 ± 0.2	0.009	0.3 ± 0.2	NS	-0.8 ± 0.4	0.03	-3.7 ± 1.5	0.01
Gr4																
M-F ^a	-21 ± 4	< 2 · 10 ⁻¹⁶	-20 ± 5	< 2 · 10 ⁻¹⁶	0.0 ± 0.01	< 2 · 10 ⁻¹⁶	0.0 ± 0.01	< 2 · 10 ⁻¹⁶								

Statistical Significances were established in 0.05.

^a The phenotypes with gender influence were shown by males (M) and females (F).

^b Phenotypes obtained by the Sysmex XE-2100[®].

^c Phenotypes obtained by the Sysmex KX-21N[®].

4. Conclusions

We used the LME model to study the effect of age and gender on 15 platelet phenotypes. Our results suggest that two age groups should be considered clinically: childhood, ranging from 2 to 12 years, and the mature group, from 13 to 93 years. Several studies have analysed several haematological parameters of the red and white blood counts [35,40], and the PBC [30,31,34,41], but there are few studies that analysed comprehensively how age and gender affect other platelet phenotypes, such as the IPF and PFA phenotypes.

One of the first aims of the present study was to compare the measurements of the Sysmex XE-2100[®] and Sysmex KX-21N[®] analysers. The PLT, PLTOP, MPV and PCT have been analysed largely by the Sysmex XE-2100[®] [9,24]. However, there are few studies that analyse the PLT40, MPV40 and PCT40 obtained by the Sysmex KX-21N[®] [33,42]. The present study showed significant differences when measuring the same phenotypes with different analysers (PLT and PLT40, MPV and MPV40, and PCT and PCT40). The results obtained with the phenotypes assessed with both analysers were consistent.

We found that all the platelet counts (PLT, PLTOP and PLT40) decrease with age (Fig. 1a). In accordance with previous studies [25,27,43], we also found that the PLT, PLTOP and PLT40 had higher counts in females than in males. An Italian study [25] estimated also that the PLT decreases in older ages more than 35% in men and 25% in women. It has been reported also that the MPV phenotype increases with age [6,23,44]. Besides the MVP, the other platelet volumes (PDW and P-LCR) and the IPF phenotypes, showed increased values with age, but had no gender effect (Fig. 1b). There are some studies [16,17,45] that define the mean and CI of IPF values in different ethnic populations such as Korean (3.4%, 1.1–6.1%), Japanese (3.3%, 1.0–10.3%) or Indian (2.1%, 0.3–8.7%) adults. In our study, the levels of IPF phenotypes (IPF%, IPF#, HIPF% and IPF-X) in the childhood group (Group 1) were significantly lower than the adulthood (Group 3) and elder (Group 4) groups. We also observed that the IPF% increase with age [16]. No gender effect in the adulthood group, unlike the Korean and European studies [9]. We did not observe either an age or a gender effect on PFA phenotypes (Fig. 2a and b), as it has been previously reported [19,21]. Our study in extended Spanish pedigrees of the 15 platelet phenotypes replicate earlier studies [16,25,30], and it provides a better understanding of the PBC behaviour throughout the life.

We also performed a comprehensive analysis of the influence of age and gender on platelet function. In healthy population, the platelet dynamics have been characterized previously taking into account the effect of different covariates [22,25,30], analysing a single [25,33] or a few platelet phenotypes [23,27,29,34], such as the platelet counts, MPV or PCT phenotypes. These previous reports led us to the partition of the subjects into different age and gender groups. With this approach, we were able to replicate earlier studies [25,27]. Regarding other phenotypes, such as the IPF and PFA phenotypes, we report a novel regression-based model taking into account the effect of the age and gender. For instance, the IPF%, IPF# and IPF-X showed a similar dynamics than the MPV (Fig. 1b). Previous studies [14,16] in patients with

The CT values of PFAadp and PFAepi were shorter in Group 1 than the rest of the age groups (Table 6). For the PFAadp, the CT mean value in Group 1 (83 seconds) was shorter than in Group 3 (87 seconds). In addition for the PFAepi, the CT mean value in Group 1 (113 seconds) was shorter than in Group 3 (121 seconds). For PFA phenotypes, statistical differences were observed between Group 1 and Group 3 (Fig. 2a and b, Table 7).

Table 6

Means and confidence intervals for the IPF and PFA phenotypes.

	IPF% ^a	IPF# (× 10 ⁹ /L) ^a	HIPF% ^a	IPF-X ^a	PFAadp (s) ^b	PFAepi (s) ^b
Group 1	1.92 (1.61–2.23)	5.27 (4.69–5.86)	0.56 (0.45–0.67)	16.06 (15.56–16.55)	83 (80–87)	113 (108–118)
Group 2	2.67 (2.24–3.10)	5.86 (5.04–6.67)	0.78 (0.62–0.93)	17.51 (16.95–18.07)	86 (81–90)	114 (107–121)
Group 3	3.32 (3.14–3.50)	7.40 (7.06–7.73)	1.01 (0.94–1.07)	18.11 (17.90–18.31)	87 (85–89)	121 (118–123)
Group 4	3.67 (3.34–4.00)	7.86 (7.24–8.49)	1.10 (0.99–1.22)	18.47 (17.90–19.04)	87 (83–90)	121 (115–127)

Confidence interval (between brackets) was fixed in 95%. **IPF%**: proportion of platelets containing RNA with respect to the platelet count (%). **IPF#**: absolute number of platelets containing RNA (× 10⁻⁹/L). **HIPF%**: proportion of platelets with the highest RNA content (%) included the IPF%. **IPF-X**: mean RNA content per platelet (fluorescence intensity).

^a Phenotypes obtained by the Sysmex XE-2100[®].

^b Phenotypes obtained by the PFA-100[®] system.

Table 7

Estimated mean differences, standard errors (SE) and *p*-values (*p*-val) between age groups for IPF and PFA phenotypes.

	IPF% ^a		IPF# (× 10 ⁹ /L) ^a		HIPF% ^a		IPF-X ^a		PFAadp (s) ^b		PFAepi (s) ^b	
	Mean ± SE	<i>p</i> -val	Mean ± SE	<i>p</i> -val	Mean ± SE	<i>p</i> -val	Mean ± SE	<i>p</i> -val	Mean ± SE	<i>p</i> -val	Mean ± SE	<i>p</i> -val
Gr 3 - Gr 1	1.4 ± 0.27	< 2 · 10 ⁻¹⁶	2.1 ± 0.32	< 2 · 10 ⁻¹⁶	0.4 ± 0.06	< 2 · 10 ⁻¹⁶	2.0 ± 0.26	< 2 · 10 ⁻¹⁶	3.8 ± 1.81	0.04	7.5 ± 2.85	0.009
Gr 3 - Gr 2	0.7 ± 0.23	0.004	1.5 ± 0.43	4 · 10 ⁻⁴	0.2 ± 0.08	0.004	0.6 ± 0.29	0.04	1.5 ± 2.33	NS	7.1 ± 3.75	NS
Gr 3 - Gr 4	-0.3 ± 0.19	NS	-0.5 ± 0.36	NS	-0.1 ± 0.06	NS	-0.4 ± 0.30	NS	0.7 ± 2.10	NS	-0.3 ± 3.35	NS
Gr 1 - Gr 2	-0.7 ± 0.26	0.004	-0.6 ± 0.50	NS	-0.2 ± 0.09	0.002	-1.5 ± 0.37	1 · 10 ⁻⁴	-2.3 ± 2.72	NS	-0.4 ± 4.34	NS
Gr 1 - Gr 4	-1.7 ± 0.23	< 2 · 10 ⁻¹⁶	-2.6 ± 0.43	< 2 · 10 ⁻¹⁶	-0.5 ± 0.08	< 2 · 10 ⁻¹⁶	-2.4 ± 0.38	< 2 · 10 ⁻¹⁶	-3.1 ± 2.5	NS	-7.8 ± 3.99	NS
Gr 2 - Gr 4	-1.0 ± 0.27	3 · 10 ⁻⁴	-2.0 ± 0.54	1 · 10 ⁻⁴	-0.3 ± 0.09	6 · 10 ⁻⁴	-1.0 ± 0.40	0.02	-0.8 ± 2.91	NS	-7.4 ± 4.67	NS

Statistical Significances were established in 0.05. **IPF%**: proportion of platelets containing RNA with respect to the platelet count (%). **IPF#**: absolute number of platelets containing RNA (× 10⁻⁹/L). **HIPF%**: proportion of platelets with the highest RNA content (%) included the IPF%. **IPF-X**: mean RNA content per platelet (fluorescence intensity).

^a Phenotypes obtained by the Sysmex XE-2100[®].

^b Phenotypes obtained by the PFA-100[®] system.

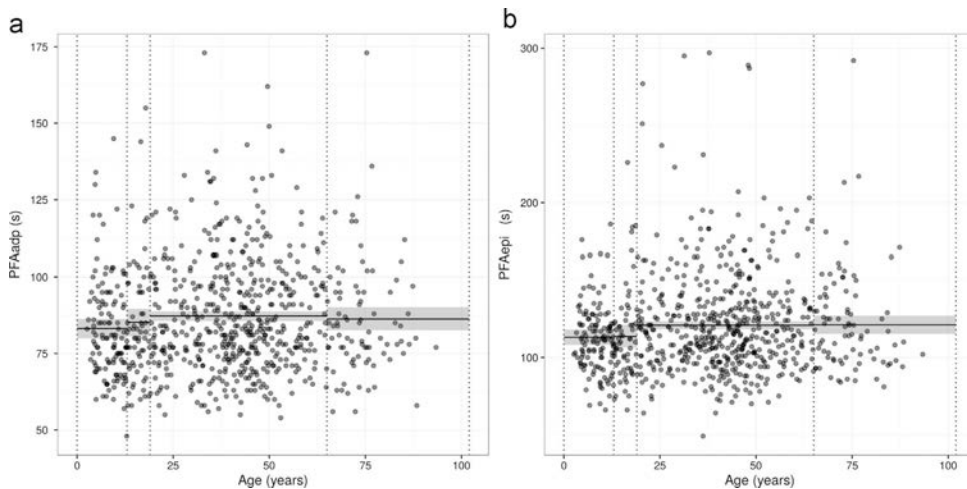


Fig. 2. Mean values per age group in PFA phenotypes. (a) The mean in PFAadp (seconds), (b) and the mean in PFAepi (seconds) phenotypes. Both phenotypes show a constant mean values along the age without gender influence. The 95% confidence intervals for model parameters were estimated by the bootstrap method with 1000 iterations.

thrombocytopenia (low platelet counts) reported high IPF values. Therefore, the IPF phenotypes are commonly used as markers to determine if the platelet production is abnormal in aplastic anaemia, with an IPF% mean value of 7.7% (range, 1.0–33.8%) [16]. It is also used to measure platelet over destruction in immune thrombocytopenic purpura (ITP), with an IPF mean value of 3.5% (range, 0.6–12.9%) [16]. Previous studies also have reported [25], thrombocytopenia in children or thrombocytosis in elders could be wrongly diagnosed. As a result of the present study, we propose a new partitioning strategy for the age group to study these 15

platelet phenotypes. In this study, statistically differences between the childhood (Group 1) and adulthood (Group 3) groups (Tables 5 and 7). Consequently, we suggest, under a practical point of view, to only consider two age groups clinically: childhood, ranging from 2 to 12 years, and the mature group, from 13 to 93 years.

The platelet counts and MPV are the phenotypes most commonly analysed by the clinicians. Previous studies suggest that there is an inverse and non-linear correlation between the platelet counts and the mean platelet volume phenotypes [27,30,34]. We

attempted to replicate these results, by means of a regression-based model that characterizes the platelet phenotypes according to different age groups (Fig. 1a and b). Our models estimated the relationship between each phenotype and an age group. We found that there was a tendency for the platelet counts to be higher in the childhood group than in the other age groups (Fig. 1a), while the MPV increased more abruptly in the childhood group (Fig. 1b).

Although, the PFA-100® system is unspecific to any particular platelet disorder, it might be a useful screening test for the platelet dysfunction [19,46]. Thus, the measurement of the PFA phenotypes could be considered a proper global test system for primary haemostasis. The present study reports significant differences between the CT of the childhood (Group1) and adulthood (Group 3) groups for both PFA phenotypes, as previous study have reported [46]. In addition, any other statistical differences were observed among the other age groups for the PFAadp and PFAepi (Table 7). Thus, the non-linear and inverse correlation between both platelet phenotypes (platelet counts and MPV) might be explained by a biological trend to maintain invariably the platelet mass and the platelet function throughout the life of the individual [47] (Fig. 2a and b).

Although we have confirmed previous findings, in the present work we report the results from a more comprehensive view of the platelet-related parameters and the platelet function, and its variation throughout the life of the individual. In addition, our study proposes a new approach to analyse a sample of related individuals (within extended Spanish pedigrees) by means of linear mixed regression models. We believe that the same approach should be considered for other study designs where the population stratification is an issue, for example, a sample measured among different geographical regions [25] or ethnic groups [26]. Finally, our results support the hypothesis that platelet function is maintained invariably over time.

Conflict of interest statement

The authors report no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank the families who participated in the GAIT 2 Project. The authors thank Siemens Healthcare Diagnostics (Marburg, Germany) and Roche Diagnostics (Basel, Switzerland) for the technological support. We also would like to thank Professor Bill Stone for reviewing the manuscript.

This work was supported in part by the Spanish grant: Red Investigación Cardiovascular RD12/0042/0032.

References

- [1] J.N. Thon, J.E. Italiano, Platelet formation, *Semin. Hematol.* 47 (2010) 220–226.
- [2] S. Lindemann, M. Gawaz, The active platelet: translation and protein synthesis in an anucleate cell, *Semin. Thromb. Hemost.* 33 (2007) 144–150.
- [3] K. Ivory, B. Sarria, S.J. Fairweather-Tait, D.A. Hughes, Reticulated platelets interfere with flow cytometric reticulocyte counts, *Int. J. Lab. Hematol.* 29 (2007) 352–360.
- [4] J.N. Thon, J.E. Italiano, Platelets: production, morphology and ultrastructure, *Handb. Exp. Pharmacol.* 210 (2012) 3–22, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5_1.
- [5] M.E. Daly, Determinants of platelet count in humans, *Haematologica* 96 (2011) 10–13.
- [6] M. Buttarello, M. Plebani, Automated blood cell counts state of the art, *Am. J. Clin. Pathol.* 130 (2008) 104–116.
- [7] C. Briggs, Quality counts: new parameters in blood cell counting, *Int. J. Lab. Hematol.* 31 (2009) 277–297.

- [8] C. Briggs, P. Harrison, D. Grant, J. Staves, S.J. MacHinn, New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter—the XE 2100, *Clin. Lab. Haematol.* 22 (2000) 345–350.
- [9] J.M.P. Pekelharing, O.H. Auss, R.D.J. Onge, J.L. Okhoff, J.S. Odikromo, M.S. Paans, et al., Haematology reference intervals for established and novel parameters healthy adults, *Sysmex J. Int.* 20 (2010) 1–9.
- [10] G. Slavka, T. Perkmann, H. Haslacher, S. Greisenegger, C. Marsik, O.F. Wagner, et al., Mean platelet volume may represent a predictive parameter for overall vascular mortality and ischemic heart disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 1215–1218.
- [11] C. Briggs, P. Harrison, S.J. Machinn, Continuing developments with the automated platelet count, *Int. J. Lab. Hematol.* 29 (2007) 77–91.
- [12] E. Vagdatli, E. Gounari, E. Lazaridou, E. Katsibourlia, F. Tsikopoulou, I. Labrianou, Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation, *Hippokratia* 14 (2010) 28–32.
- [13] M.M. Khandekar, A.S. Khurana, S.D. Deshmukh, A.L. Kakrani, A.D. Kadtare, A. K. Inamdar, Platelet volume indices in patients with coronary artery disease and acute myocardial infarction: an Indian scenario, *J. Clin. Pathol.* 59 (2006) 146–149.
- [14] K. Kaito, H. Otsubo, N. Usui, M. Yoshida, J. Tanno, E. Kurihara, et al., Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia, *Br. J. Haematol.* 128 (2005) 698–702.
- [15] H.Z.W. Grotto, J.F.A. Noronha, Platelet larger cell ratio (P-LCR) in patients with dyslipidemia, *Clin. Lab. Haematol.* 26 (2004) 347–349.
- [16] H. Jung, H.-K. Jeon, H.-J. Kim, S.-H. Kim, Immature platelet fraction: establishment of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia, *Korean J. Lab. Med.* 30 (2010) 451–459.
- [17] Y. Abe, H. Wada, H. Tomatsu, A. Sakaguchi, J. Nishioka, Y. Yabu, et al., A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF), *Thromb. Res.* 118 (2006) 463–469.
- [18] B. Jilma, Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction, *J. Lab. Clin. Med.* 138 (2001) 152–163.
- [19] E.J. Favaloro, Utility of the PFA-100 for assessing bleeding disorders and monitoring therapy: a review of analytical variables, benefits and limitations, *Haemophilia* 7 (2001) 170–179.
- [20] P. Harrison, M. Robinson, R. Liesner, K. Khair, H. Cohen, I. Mackie, et al., The PFA-100: a potential rapid screening tool for the assessment of platelet dysfunction, *Clin. Lab. Haematol.* 24 (2002) 225–232.
- [21] A. Sestito, A. Sciahbasi, R. Landolfi, A. Maseri, G.A. Lanza, F. Andreotti, A simple assay for platelet-mediated hemostasis in flowing whole blood (PFA-100): reproducibility and effects of sex and age, *Cardiology* 44 (1999) 661–665.
- [22] C.L. Balduini, P. Noris, Platelet count and aging, *Haematologica* 99 (2014) 953–955.
- [23] M. Lozano, J. Narváez, A. Faúndez, R. Mazzara, J. Cid, J.M. Jou, et al., Platelet count and mean platelet volume in the Spanish population, *Med. Clin.* 110 (1998) 774–777.
- [24] L. Mogongoa, J. Botma, A. Jaftha, W.J. van Rensburg, Reference ranges for platelet indices using Sysmex XE-2100 blood analyser, *Med. Technol. SA* 26 (2012) 17–21.
- [25] G. Biino, I. Santimone, C. Minelli, R. Sorice, B. Frongia, M. Traglia, et al., Age- and sex-related variations in platelet count in Italy: a proposal of reference ranges based on 40987 subjects' data, *Plos One* 8 (2013) e54289.
- [26] J.B. Segal, A.R. Moliterno, Platelet counts differ by sex, ethnicity, and age in the United States, *Ann. Epidemiol.* 16 (2006) 123–130.
- [27] B.J. Bain, Platelet count and platelet size in males and females, *Scand. J. Haematol.* 35 (1985) 77–79.
- [28] A. Giacomini, P. Legovini, G. Gessoni, F. Antico, S. Valverde, M.M. Salvadego, et al., Platelet count and parameters determined by the Bayer ADVIA 120 in reference subjects and patients, *Clin. Lab. Haematol.* 23 (2001) 181–186.
- [29] J. Romeo, J. Wärnberg, S. Gómez-Martínez, L.E. Díaz, L.A. Moreno, M.J. Castillo, et al., Haematological reference values in Spanish adolescents: the AVENA study, *Eur. J. Haematol.* 83 (2009) 586–594.
- [30] M.R. Taylor, C.V. Holland, R. Spencer, J.F. Jackson, G.I. O'Connor, J.R. O'Donnell, Haematological reference ranges for schoolchildren, *Clin. Lab. Haematol.* 19 (1997) 1–15.
- [31] L. Armando García-Miranda, I. Contreras, J.A. Estrada, Full blood count reference values in children of 8 to 12 years old residing at 2760 m above sea level, *An. Pediatr.* 80 (2014) 221–228.
- [32] G. Biino, P. Gasparini, P. D'Adamo, M. Ciullo, T. Nutile, D. Toniolo, et al., Influence of age, sex and ethnicity on platelet count in five Italian geographic isolates: mild thrombocytopenia may be physiological, *Br. J. Haematol.* 157 (2012) 384–387.
- [33] L. Quintó, J.J. Aponte, J. Sacarlal, M. Espasa, P. Aide, I. Mandomando, et al., Haematological and biochemical indices in young African children: in search of reference intervals, *Trop. Med. Int. Health* 11 (2006) 1741–1748.
- [34] M.C. Becerra-Flores, J.M. Farfán-Canto, B. Nieva-García, A. Fajardo-Gutiérrez, Platelet reference values in healthy children living in Mexico City, *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 44 (2006) 121–130.
- [35] E.S. Lugada, J. Mermin, F. Kaharuzza, E. Ulvestad, W. Were, N. Langeland, et al., Population-based hematologic and immunologic reference values for a healthy Ugandan population, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11 (2004) 29–34.
- [36] J.C. Souto, L. Almasy, M. Borrell, F. Blanco-Vaca, J. Mateo, J.M. Soria, et al., Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study, Genetic analysis of idiopathic thrombophilia, *Am. J. Hum. Genet.* 67 (2000) 1452–1459.

- [37] D. Bates, M. Mächler, B. Bolker, S. Walke, Fitting linear mixed-effects models using lme4, 2014, 51.
- [38] A. Kuznetsova, P.B. Brockhoff, C. Rune Haubo Bojesen, Tests for random and fixed effects for linear mixed effect models (lmer objects of lme4 package), 2014. (<http://cran.r-project.org/web/packages/lmerTest/>).
- [39] J. Blangero, L. Almasy, Multipoint oligogenic linkage analysis of quantitative traits, *Genet. Epidemiol.* 14 (1997) 959–964.
- [40] I.M. Appel, B. Grimminck, J. Geerts, R. Stigter, M.H. Cnossen, A. Beishuizen, Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty, *J. Thromb. Haemost.* 10 (2012) 2254–2263.
- [41] I. Santimone, A. Di Castelnuovo, A. De Curtis, M. Spinelli, D. Cugino, F. Gianfagna, et al., White blood cell count, sex and age are major determinants of heterogeneity of platelet indices in an adult general population: results from the MOLI-SANI project, *Haematologica* 96 (2011) 1180–1188.
- [42] T. Barman, R. Kalahasthi, H.R. Rajmohan, Effects of lead exposure on the status of platelet indices in workers involved in a lead-acid battery manufacturing plant, *J. Expo. Sci. Env. Epidemiol.* 24 (2014) 629–633.
- [43] M.F. Buckley, J.W. James, D.E. Brown, G.S. Whyte, M.G. Dean, C.N. Chesterman, et al., A novel approach to the assessment of variations in the human platelet count, *Thromb. Haemost.* 83 (2000) 480–484.
- [44] G. Lippi, T. Meschi, L. Borghi, Mean platelet volume increases with aging in a large population study, *Thromb. Res.* 129 (2012) e159–e160.
- [45] R. Sachdev, A.K. Tiwari, S. Goel, V. Raina, M. Sethi, Establishing biological reference intervals for novel platelet parameters (immature platelet fraction, high immature platelet fraction, platelet distribution width, platelet large cell ratio, platelet-X, plateletcrit, and platelet distribution width) and their correlations among each other, *Indian J. Pathol. Microbiol.* 57 (2) (2014) 231–235, <http://dx.doi.org/10.4103/0377-4929.134676>.
- [46] E.J. Favaloro, Clinical utility of the PFA-100, *Semin. Thromb. Hemost.* 34 (2008) 709–733.
- [47] G. de Gaetano, I. Santimone, F. Gianfagna, L. Iacoviello, C. Cerletti, Variability of platelet indices and function: acquired and genetic factors, *Handb. Exp. Pharmacol.* 210 (2012) 395–434, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5_16.

Estudio #1

Resultados suplementarios

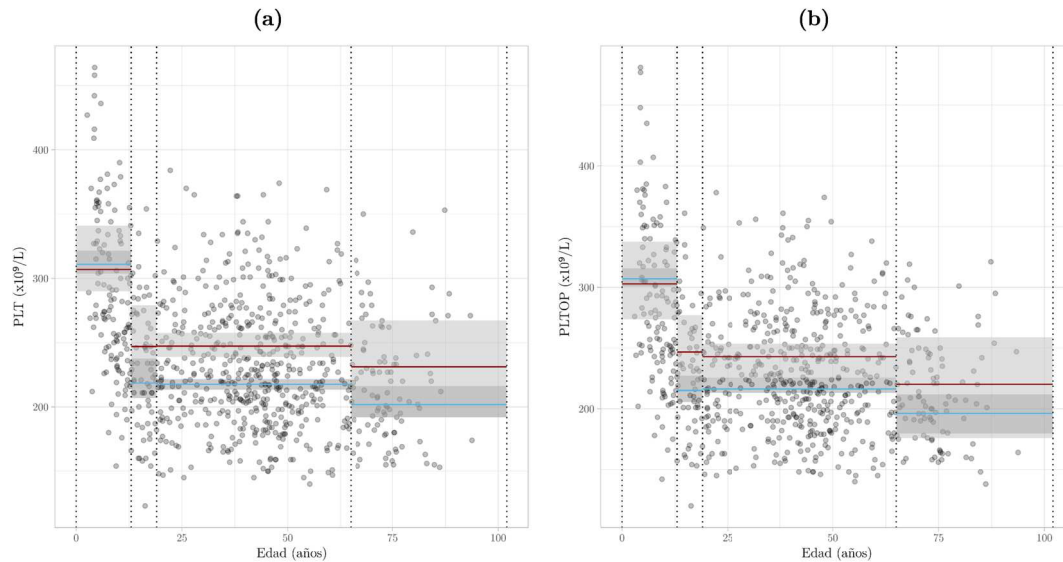


Figura 3.1: Recuentos plaquetarios, según grupos de edad y sexo, obtenidos por el canal de (a) impedancia (PLT) y (b) óptico (PLTOP) del analizador hematológico Sysmex XE-2100®, en el proyecto GAIT 2. Los grupos de edad se han separado por líneas verticales: grupo 1 (población infantil), de 2 a 12 años; grupo 2 (población adolescente) de 13 a 18 años; grupo 3 (población adulta) de 19 a 64 años y grupo 4 (población anciana) de 65 a 93 años. Para los hombres, las medias de los recuentos por grupo se han representado en líneas de color azul e intervalos de confianza (CI) del 95% en color gris oscuro. Para las mujeres, las medias de los recuentos se han representado con líneas de color rojo y CI del 95% en color gris claro.

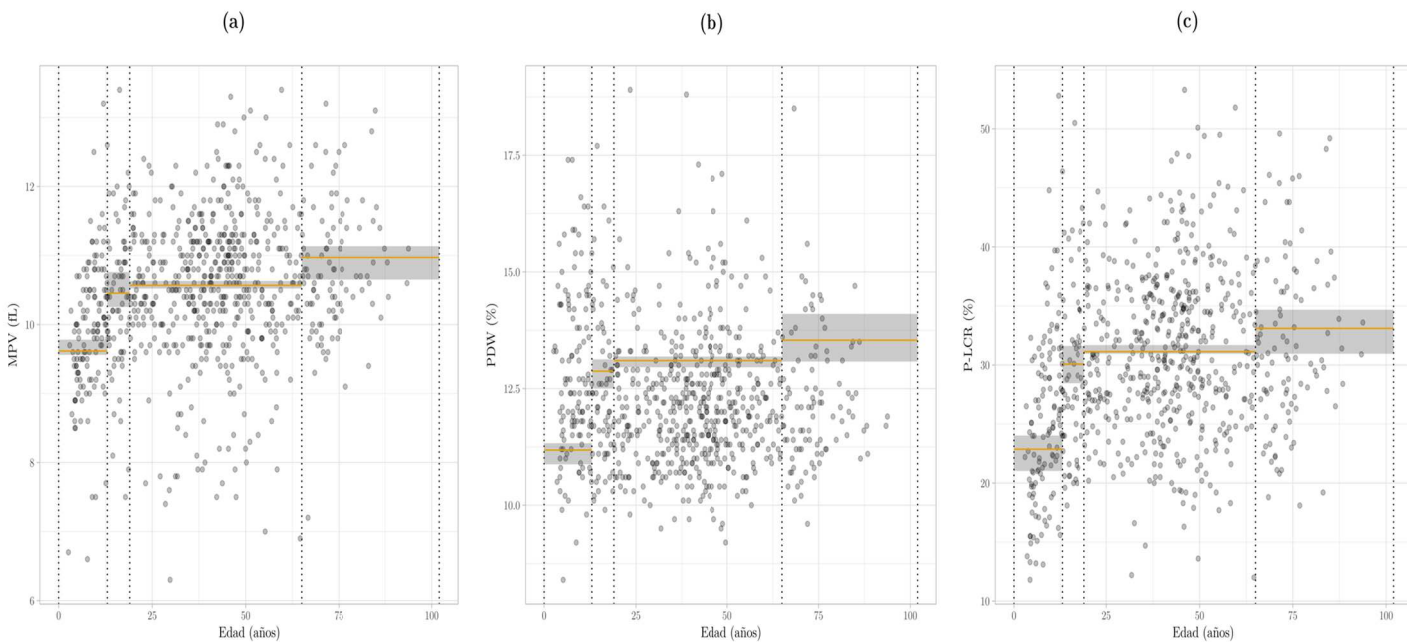


Figura 3.2: Los parámetros de volumen, según grupos de edad, obtenidos por del analizador hematológico Sysmex XE–2100®, en el proyecto GAIT 2. Los grupos de edad se han separado por líneas verticales: grupo 1 (población infantil), de 2 a 12 años; grupo 2 (población adolescente) de 13 a 18 años; grupo 3 (población adulta) de 19 a 64 años y grupo 4 (población anciana) de 65 a 93 años. Para (a) el MPV, y los diferentes parámetros relacionados con el volumen, como (b) el P–LCR o (c) el PDW, se han representado en líneas de color amarillo las medias de los grupos e intervalos de confianza (CI) del 95% en color gris oscuro.

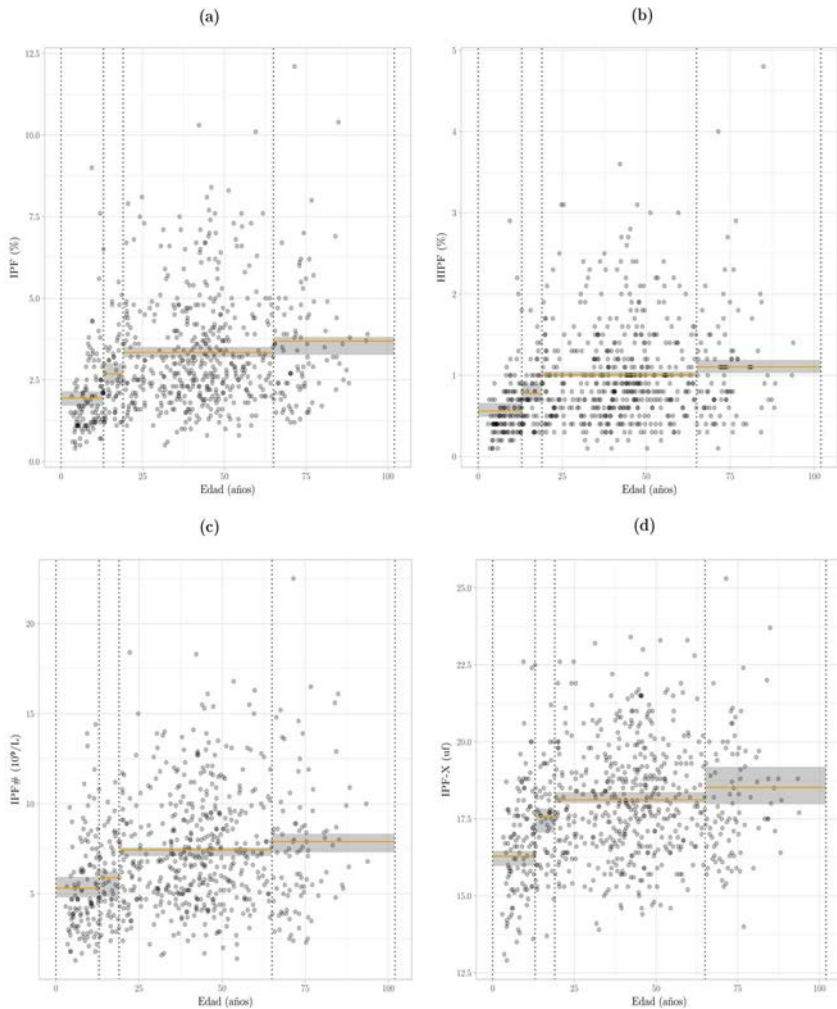


Figura 3.3: Parámetros plaquetarios de inmadurez, según grupos de edad obtenidos por el canal óptico del analizador hematológico Sysmex XE-2100®, en el proyecto GAIT 2. Los grupos de edad se han separado por líneas verticales: grupo 1 (población infantil), de 2 a 12 años; grupo 2 (población adolescente) de 13 a 18 años; grupo 3 (población adulta) de 19 a 64 años y grupo 4 (población anciana) de 65 a 93 años. Para (a) el IPF%, (b) el HIPF%, (c) el IPF# y (d) el IPF-X, medido en unidades de fluorescencia (uf), las medias de los recuentos por grupo se han representado en líneas de color amarillo e intervalos de confianza (CI) del 95% en color gris oscuro.

Estudio #2

Genetic determinants of platelet large-cell ratio,
immature platelet fraction, and other platelet-
related phenotypes



Contents lists available at ScienceDirect

Thrombosis Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/thromres

Full Length Article

Genetic determinants of Platelet Large-Cell Ratio, Immature Platelet Fraction, and other platelet-related phenotypes

Núria Pujol-Moix^{a,b,*}, Miquel Vázquez-Santiago^{a,1}, Agnès Morera^{a,1}, Andrey Ziyatdinov^{c,3}, Angel Remacha^{d,4}, Josep F. Nomdedeu^{d,4}, Jordi Fontcuberta^{a,1}, José Manuel Soria^{c,3}, Juan Carlos Souto^{a,1}^a Unitat d'Hemostàsia i Trombosi, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain^b Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain^c Unit of Genomics of Complex Diseases, Sant Pau Institute of Biomedical Research (IIB-Sant Pau), Barcelona, Spain^d Servei de Laboratori d'Hematologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2015

Received in revised form 18 May 2015

Accepted 14 June 2015

Available online 17 June 2015

Keywords:

Platelets

Platelet large-cell ratio

Immature platelet fraction

Thrombophilia

Heritability

ABSTRACT

Introduction: Platelets play a significant role in arterial thrombosis and are involved also in venous thrombosis. The genetic determinants of several platelet-related phenotypes have been studied previously. However, to the best of our knowledge, the genetic determinants of other platelet phenotypes have not been reported such as platelet-large-cell ratio (P-LCR) index, immature platelet fraction (IPF) parameters and overall platelet function measured through the PFA-100 system.

Materials and Methods: As part of the GAIT-2 (Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia 2) Project, 935 individuals from 35 large Spanish families, ascertained through a proband with thrombophilia, were studied. Using variance component methods, implemented in the SOLAR package, the heritability of the following sets of platelet-related phenotypes was determined: platelet count and indices, IPF, and platelet function.

Results and Conclusions: High heritabilities of the platelet count and index phenotypes (from 0.41 to 0.64) were found, especially for those related to platelet volume. The heritabilities of the IPF phenotypes, as a measure of platelet turnover, were the highest (from 0.65 to 0.69). The heritabilities of the platelet function phenotypes were high also (0.45 and 0.62). The covariate age influenced all of the platelet phenotypes. Smoking influenced the platelet indices related to platelet volume and all the IPF phenotypes. Venous thrombosis showed a heritability of 0.67. We did not find a genetic correlation between any of the platelet-related phenotypes and venous thrombosis. The high heritabilities found for all of the platelet phenotypes provide promising data for the identification of new genes that underlie these phenotypes.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The development of thrombosis depends on a complex and variable interaction between genetic and environmental factors. Several genetic abnormalities that determine susceptibility to thrombosis have been described. However, in more than 50 % of the families with thrombosis

none of these abnormalities is found [1]. Despite this fact, and by using a family-based approach, we demonstrated that the heritability of the liability to thromboembolic disease in the Spanish general population is higher than 60 % [2]. Ulterior studies, using different strategies, gave similar results [3]. The high heritability of the risk of thrombosis indicates the importance to search for susceptibility genes. The identification of these

Abbreviations: c², household effect; Col-ADP, cartridge of the PFA-100 device containing a membrane coated with both collagen and ADP; Col-Epi, cartridge of the PFA-100 device coated containing a membrane coated with both collagen and epinephrine; GAIT Project, Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia Project; GAIT-1 Project, First phase of the GAIT Project; GAIT-2 Project, Second phase of the GAIT Project; h², heritability; HIPP%, percentage of the most immature platelets, included in IPF%; IPF, immature platelet fraction = fraction of platelets containing RNA; IPF%, percentage of immature platelets with respect to the platelet count; IPF#, absolute number of immature platelets; IPF-X, mean RNA content per platelet; MPV, mean platelet volume; P-LCR, platelet-large cell ratio = percentage of platelets measuring more than 12 fl; PCT, plateletcrit; PDW, platelet distribution width; SOLAR, computer package Sequential Oligogenic Linkage Analysis Routines.

* Corresponding author at: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Unitat d'Hemostàsia i Trombosi, Sant Antoni M. Claret, 167, Barcelona-08025, Spain.

E-mail addresses: npujolmoix@gmail.com (N. Pujol-Moix), mvazquez@santpau.cat (M. Vázquez-Santiago), ambnesi@gmail.com (A. Morera), azyatdinov@santpau.cat (A. Ziyatdinov), aremacha@santpau.cat (A. Remacha), jnomdedeu@santpau.cat (J.F. Nomdedeu), jfontcuberta@santpau.cat (J. Fontcuberta), jsoria@santpau.cat (J.M. Soria), jsouto@santpau.cat (J.C. Souto).

¹ Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Unitat d'Hemostàsia i Trombosi, Sant Antoni M. Claret, 167, Barcelona-08025, Spain.² Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Unitat Docent, Sant Antoni M. Claret, 167, Barcelona-08025, Spain.³ Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Unitat de Genòmica de Malalties Complexes, Sant Antoni M. Claret, 167, Barcelona-08025, Spain.⁴ Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Servei de Laboratori d'Hematologia, Sant Antoni M. Claret, 167, Barcelona-08025, Spain.

genes would be of great interest for subsequent screening in the general population to identify people at risk. It may help also to understand the mechanism underlying the increased risk of thrombosis, thereby suggesting preventive strategies. This would lead ultimately to reduce the thrombotic-related morbidity and mortality in the population.

The classical case–control studies have evaluated by association whether a gene has any effect on the risk of thrombosis [1]. However, this approach is not useful for identifying unknown genes with effects on the disease. Unlike case–control studies, the GAIT (Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia) Project is a family-based genetic study that is able to localize directly the potential effect of a locus through pedigree-based variance component analyses [4]. The first step of this type of study is to select intermediate phenotypes that could play a role in the susceptibility to thrombosis, based on their biological activities and on previously published evidence. Then, using the variance component method, the correlation in a given phenotype between relatives leads to the partition of the variance into components attributable to genes (heritability) and to environment [2,4]. The first phase of the GAIT Project (GAIT-1) was focused mainly on coagulation phenotypes and gave interesting results [5–7].

The second phase of the GAIT Project (GAIT-2) has investigated a larger number of individuals and families and has included a larger number and types of phenotypes, among them numerous platelet-related phenotypes.

Platelets play a key role in primary hemostasis and are involved in the development of arterial thrombosis [8]. Moreover, there is growing evidence that platelets are involved also in venous thrombosis through several mechanisms such as the release of polyphosphates which activate the coagulation intrinsic pathway and increase the clot resistance to fibrinolysis [9,10], the production of procoagulant-antifibrinolytic microparticles [11] or the involvement in inflammatory cellular interactions [12,13].

Several studies have focused on whether platelet number or platelet volume (which are both determinants of platelet mass) are risk factors for thrombosis. Elevated values of mean platelet volume have been related to risk factors for cardiovascular disease, with arterial and venous thrombosis and with impaired antiplatelet therapy responses [14–19]. In contrast, increased platelet counts have failed to demonstrate a consistent association with thrombosis in the majority of studies [14–16]. Other studies have related the elevated levels of different platelet indices –plateletcrit, platelet distribution and width, platelet-large cell ratio– to risk factors for cardiovascular disease, coronary syndromes, venous thromboembolism or poor response to aspirin [19–23].

Taking into account that immature platelets have a higher functional capacity than mature platelets, it has been investigated if an increased proportion of circulating immature platelets (the immature platelet fraction or IPF) is a risk factor for thrombosis. Similar studies have been performed on the platelet hyperreactivity that leads to increased platelet activation and aggregation. Increased levels of IPF or of platelet reactivity have been related to cardiovascular risk factors, coronary diseases or poor responses to antiaggregant drugs [24–31].

Using different approaches it has been established that there is a genetic contribution to the platelet count, to some platelet index phenotypes and to some phenotypes involving platelet function [32–36]. The aim of the present study was to analyze the genetic determinants of platelet-related phenotypes, including platelet count and indices, IPF, and platelet function, as part of the GAIT-2 Project.

2. Methods

2.1. Enrollment of Individuals and Families

As part of the GAIT-2 Project, 935 individuals from 35 large Spanish families were studied at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona, Spain. The families were recruited following the same criteria as in the GAIT-1 Project [2], namely they were ascertained through a

proband with thrombophilia and the condition of having at least of 10 members and at least 3 generations. Thrombophilia was defined as multiple thrombotic events (at least one of which was spontaneous), a single spontaneous event with a first-degree relative affected also, or onset of thrombosis before age of 45 years. The thrombotic events were diagnosed by objective methods and they were considered spontaneous when all of the known biological causes of thrombosis were excluded. These exclusion criteria were: deficiencies of antithrombin, Protein S, Protein C, heparin cofactor II, or plasminogen, activated protein C resistance, Factor V Leiden, dysfibrinogenemia, lupus anticoagulant and antiphospholipid antibodies. To recruit the individuals following the same criteria as in GAIT-1 Project [2], initiated in 1995, the prothrombin A20210G mutation was not considered an exclusion criterion. The unification of the recruitment criteria would have some advantages such as to have a larger statistical sample for future analyses.

The families had between 10 and 68 individuals and all the families had three generations including 14 families with more than three generations. In total, these families gave 8649 pairs of relatives. Among the individuals studied, 465 were males and 470 were females. The mean age of the individuals was 39.5 (minimum 2.6, maximum 101, SD 21.4), and 197 of them were children up to 18-years. A total of 187 thrombotic events (121 venous and 66 arterial) were registered, affecting a total of 120 individuals: 86 with venous thrombosis, 47 with arterial thrombosis, and 13 with both.

The study was performed according to the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all adult patients and for parents of children. All procedures were approved by the Institutional Review Board at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

The subjects were interviewed by a physician to collect demographic data and medical history including episodes of venous or arterial thrombosis and the age and circumstances at which these episodes occurred. Only documented events were considered. The subjects were questioned about their current medication to confirm that they had not taken antiplatelet drugs (such as aspirin or clopidogrel) in the last two weeks or they had not taken other drugs with slight effect on platelet function (such as nonsteroidal antiinflammatory drugs or serotonin reuptake inhibitor drugs) in the last week. Also, we collected data on the smoking habit and, in women, on the use of oral contraceptives or hormonal replacement therapy.

2.2. Blood Collection and Platelet Phenotype Analyses

Whole blood samples were obtained by venipuncture, under basal conditions, after a 12-hour overnight fast, and between 9:00 and 9:30 am. to minimize the circadian fluctuation. A 5 ml sample was obtained in EDTA-K₃ for determining platelet count and indices and for IPF phenotypes. Another 5 ml sample was obtained in sodium citrate for determining platelet function. Both samples were processed within 2 and 4 hours of collection. Using the impedance channel of the automated hematology analyzer Sysmex XE-2100 (Roche Diagnostics, Kobe, Japan), the following platelet phenotypes were determined: platelet count, mean platelet volume (MPV), plateletcrit (PCT), platelet distribution width (PDW) and platelet-large cell ratio (P-LCR). In the functional description of the Sysmex XE-2100, PDW is defined as the platelet volume distribution width at the 20% frequency level, assuming that the peak height of platelet volume histogram is 100% (Fig. 1), and the P-LCR is defined as the percentage of platelets with more than 12 fl of volume (Fig. 1). Staining the cells with fluorescent dyes for RNA and using its optical channel, the Sysmex XE-2100 determined the IPF parameters: percentage of platelets containing RNA with respect to the platelet count (IPF%), absolute number of platelets containing RNA (IPF#), percentage of platelets with the highest RNA content (HIPF%), included in IPF%, and mean RNA content per platelet (IPF-X).

The overall platelet function was measured by means of a routine laboratory test in daily clinics, the PFA-100 system (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) which measures the primary hemostasis

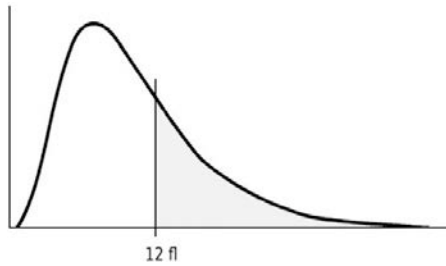


Fig. 1. Lognormal distribution curve of platelet volumes obtained in the Sysmex XE-2100. Platelets larger than 12 fl correspond to the platelet large-cell ratio or P-LCR (grey area).

by simulating *in vitro* a vessel wall under shear stress. The device contains a membrane coated with collagen that represents the vessel wall and it is coated also with ADP (cartridge Col-ADP) or with epinephrine (cartridge Col-Epi) as platelet activators. The membrane has a hole through which the anticoagulated blood passes, and the occlusion time of this hole (in seconds) is taken as the measure of platelet function. To avoid erroneous results due to thrombocytopenia or anemia, 6 individuals with platelet counts down to $100 \times 10^9/l$ and 8 individuals with hemoglobin down to 110 g/l were excluded for the of PFA-100 measurements.

2.3. Statistical Methods

The statistical methods that we applied have been described elsewhere [2,4]. Briefly, the analysis of heritability (h^2 , the relative proportion of phenotypic variance of the phenotype attributable to the effects of genes) was performed using the variance component method. The total phenotypic variance was partitioned into three components: 1) an additive genetic variance that is caused by the sum of the average effects of all the genes that influence the phenotype; and 2) a shared environmental variance that is caused by the environmental factors that are common to members of a household (c^2); and 3) a residual random environmental variance that is specific to each individual. The covariances among individuals within a family that are due to additive genetic effects were estimated as a function of their expected genetic kinship relationships. The power of this variance component approach of partition genetic and environmental effects stems from the high information content in the case of the extended pedigrees where families cut across multiple household [37]. Because the pedigrees were ascertained through a thrombophilic proband, all analyses included an ascertainment correction to allow unbiased estimation of parameters relevant to the general population [38].

Phenotype-specific covariates in the variance component models were evaluated from the following list of candidate covariates: age, sex, smoking and oral contraceptives.

The correlations between all the measured phenotypes related with platelets and disease liabilities (venous thrombosis, arterial thrombosis or all thrombosis together) were analyzed by multivariate variance component models, being an extension of the univariate model [2].

All statistical analyses were performed employing the computer package Sequential Oligogenic Linkage Analysis Routines (SOLAR, version 6.6.2, official) [37]. SOLAR employs the maximum likelihood approach for variance component models with the standard likelihood ratio tests (LRT) to evaluate the statistical significance of the model parameters [39]. P-values of less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results and Discussion

The heritability (h^2) of all of the platelet phenotypes was high (from 0.41 for platelet count to 0.69 for the IPF-X). Tables 1–3 display the descriptive statistics and h^2 of the platelet count and platelet index phenotypes, the IPF phenotypes, and the platelet function phenotypes. These tables display also the proportion of the total variance explained by the covariates that showed significant influence on each phenotype, and the list of these significant covariates for each phenotype. Only the MPV phenotype showed a slight household effect: $c^2 = 0.11$ with a p-value = 0.04 (data not shown). We do not know the cause of this effect but one could speculate about shared diet, a significant component of household. However, we have found no reference to any study on the household effect on platelet phenotypes.

The heritability for total thrombosis (arterial or venous) was 46 % ($h^2 = 0.46 \pm 0.13$; $p = 9.4 \times 10^{-5}$), and for venous thrombosis it was 67 % ($h^2 = 0.67 \pm 0.17$; $p = 1.6 \times 10^{-6}$). The heritability for arterial thrombosis ($h^2 = 0.23 \pm 0.19$; $p = 0.14$) was not significantly different from 0. Although both, total and venous thrombosis and platelet-related phenotypes, displayed high heritabilities, no genetic correlation was found between thrombosis and any of the platelet phenotypes (data not shown). These results do not exclude a genetic relationship of the platelet phenotypes with thrombosis. Simply, they indicate that if this relationship exists, as has been suggested in the past [11,12], other platelet mechanisms not explored in the GAIT-2 could be involved. Among them, the platelet release of prothrombotic factors, platelet-related immune or inflammatory mechanisms or platelet disturbances caused by aberrant cell proliferation.

It is well accepted that the number and volume of platelets, namely the platelet mass, are determined genetically to a great degree. A specific amount of circulating platelet mass is essential for maintaining appropriate hemostatic function. This is achieved with a constant balance among production, distribution and destruction of platelets through a set of coordinated mechanisms [40] under a fine regulation which involves transcription factors, growth factors, and negative regulatory molecules, all of them susceptible to genetic variation. Significant h^2 values for all platelet count and index phenotypes were found, with

Table 1
Platelet count and platelet index phenotypes. Descriptive statistics and heritability.

	PLT	MPV	PCT	PDW	P-LCR
Reference values ^(a)	140 - 300	7.5 - 11.5	0.200 - 0.310	11.1 - 14.1	21.5 - 37.0
Median (SD)	237 (61)	10.5 (1.1)	0.251 (0.059)	12.9 (1.96)	30.4 (7.37)
Min - Max	80 - 527	6.3 - 14.1	0.090 - 0.550	8.7 - 35.0	11.8 - 57.1
1st - 3rd Quartile	197 - 272	9.9 - 11.2	0.210 - 0.280	11.7 - 13.9	25.4 - 35.3
h^2 (SD)	0.41 (0.062)	0.50 (0.063)	0.42 (0.063)	0.65 (0.055)	0.64 (0.056)
p value of h^2	1.25×10^{-15}	5.16×10^{-20}	8.02×10^{-15}	1.23×10^{-30}	5.92×10^{-32}
Effect of covariates ^(b)	0.16	0.06	0.13	0.08	0.08
Covariates ^(c)	age, sex	age, smoking	age, sex	age, smoking	age, smoking

PLT: platelet count ($\times 10^9/l$); MPV: mean platelet volume (fl); PCT: plateletcrit (%); PDW: platelet distribution width (fl); P-LCR: platelet large-cell ratio (%); SD: standard deviation; h^2 : heritability (ranges from 0 to 1).

^(a) Reference values for Spanish adult individuals, taken from the Hematology Laboratory of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain).

^(b) Proportion of the total variance explained by the covariates.

^(c) Covariates that affect significantly the total variance.

Table 2
Immature platelet fraction phenotypes. Descriptive statistics and heritability.

	IPF%	IPF#	HIPF%	IPF-X
Median (SD)	3.26 (1.98)	7.13 (3.43)	1.00 (0.79)	17.97 (2.06)
Min - Max	0.40 - 19.00	1.30 - 41.30	0.10 - 11.90	12.90 - 28.90
1st - 3rd Quartile	2.00 - 4.00	4.70 - 8.90	0.50 - 1.20	16.60 - 19.10
h^2 (SD)	0.65 (0.060)	0.67 (0.060)	0.59 (0.064)	0.69 (0.057)
p value of h^2	8.30×10^{-29}	4.71×10^{-28}	2.28×10^{-24}	2.33×10^{-31}
Effect of covariates ^(a)	0.10	0.05	0.10	0.05
Covariates ^(b)	age, smoking	age, smoking, con	age, sex, smoking	age, smoking, con

IPF%: proportion of platelets containing RNA with respect to the platelet count (%).

IPF#: absolute number of platelets containing RNA ($\times 10^9/l$).

HIPF%: proportion of platelets with the highest RNA content (%), included in IPF%.

IPF-X: mean RNA content per platelet (fluorescence intensity).

SD: standard deviation; h^2 : heritability (ranges from 0 to 1).

con: oral contraception.

^(a) Proportion of the total variance explained by the covariates.

^(b) Covariates that affect significantly the total variance.

strong statistical significance (Table 1). The h^2 of platelet count, MPV and PCT were 0.41, 0.50 and 0.42 respectively.

Although in all previous studies the genetic component of the platelet phenotypes was important, their values showed a wide range, from 0.54 to 0.87 for platelet count and from 0.55 to 0.88 for MPV [36,41]; the only h^2 reported for PCT was 0.53 [42]. These differences could be explained by differences in the ethnic group or other population characteristics, the study design (twins or families, candidate genes or GWAS), the covariates included in the statistic calculations, or the type of hematologic counter used to obtain the platelet phenotypes. The heritabilities of PDW and P-LCR indices were 0.65 and 0.64, respectively. The h^2 of PDW has been previously described as 0.37 [42]. However, we did not find any previous description of the h^2 of P-LCR.

Interestingly, MPV, PDW, and P-LCR showed the highest h^2 among the platelet indices. All of these phenotypes represent different estimates of the platelet volume. MPV is the mean platelet volume and P-LCR is the percentage of platelets measuring more than 12 fl. PDW is the width of the platelet-volume distribution curve and can also be considered a measure of platelet volume because the curve of the platelet-volume distribution is lognormal (Fig. 1) reflecting the relatively high number of small platelets and the relatively low number of large platelets. As a result, an increase in the number of large platelets rather than an increase in the number of small platelets would lead to an increase in PDW.

Under physiological conditions, there is a small subpopulation of immature platelets among the circulating platelets, the IPF, which corresponds to platelets that are released recently and reflects the rate of platelet turnover. Immature platelets maintain a high capacity of producing proteins owing to significant amounts of RNA, and are larger and more

Table 3
Platelet function phenotypes. Descriptive statistics and heritability.

	Col-ADP	Col-Epi
Median (SD)	87 (20)	120 (32)
Reference values ^(a)	58 - 123	72 - 191
Min - Max	48 - 300	49 - 297
1st - 3rd Quartile	74 - 97	100 - 133
h^2 (SD)	0.45 (0.062)	0.52 (0.067)
p value of h^2	1.33×10^{-18}	2.28×10^{-18}
Effect of covariates ^(b)	.010	.001
Covariates ^(c)	age	age

Occlusion times, in seconds, obtained by the PFA-100 system using the collagen-ADP cartridge (Col-ADP) and the collagen epinephrine cartridge (Col-Epi).

SD: standard deviation; h^2 : heritability (ranges from 0 to 1).

^(a) Reference values for Spanish adult individuals, taken from the Hemostasis Laboratory of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain).

^(b) Proportion of the total variance explained by the covariates.

^(c) Covariates that affect significantly the total variance.

functional [43]. Significant high h^2 levels for all IPF phenotypes were found, ranging from 0.59 to 0.69 (Table 2). This suggests that the genetic factors influence platelet turnover, the underlying phenomenon of IPF [43]. No data have been described previously on the h^2 of any of the IPF phenotypes.

The estimates of the h^2 for the platelet function phenotypes, measured with both types of cartridges of the PFA-100 system, are described in Table 3. Using the Col-ADP cartridge the h^2 was 0.45 and using the Col-Epi cartridge it was 0.52. No previous estimates of these phenotypes have been published, although our group already delivered preliminary data in a subsample of the same GAIT-2 Project [44]. Regarding the technical characteristics of the PFA system, it should be noted that the device was designed primarily to detect decreased platelet responses and, for this reason, the membranes were coated with platelet activators (ADP or epinephrine) in addition to collagen. As in our study the PFA was used to evidence increased platelet responses, it can not be ruled out that the presence of activators decreased the variability of the measurements.

Age was a significant covariate of the h^2 of all the platelet phenotypes (Tables 1–3). Sex was a significant covariate of the h^2 of selected phenotypes: platelet count, PCT and HIPF% (Tables 1, 2). The relationship of age and sex with platelet counts and indices is well known [32,34] whereas their relationship with IPF and platelet function is less known [29]. Smoking influenced the phenotypes related with platelet volume (MPV, PDW, P-LCR), unlike sex that influenced the phenotypes mainly related with platelet count (Table 1). Smoking influenced also the h^2 of all IPF phenotypes. For a long time smoking has been associated with an increase in platelet volume, and it was suggested that this increase was related to an increase in platelet consumption and turnover [45]. Recent studies have described additional effects of smoking on cardiovascular disease [46]. Finally, the use of sex hormones influenced the variance of some IPF phenotypes: IPF# and IPF-X. It is well known that the use of sex hormones increases the risk of venous thrombosis and the changes in estrogens and estrogen receptors associated with aging may contribute to this risk. Different authors have described an increase in the IPF and in platelet functions related to the use of sex hormones [47] whereas others have demonstrated negative effects on platelet function and a protective role on vascular diseases [48]. Further studies are needed to clarify the role of sex hormones on IPF.

4. Conclusions

We have determined the heritabilities of a selected number of platelet-related phenotypes that in principle could represent intermediate phenotypes for the risk of thrombosis. Even though we did not find a correlation between the platelet phenotypes and thrombosis, we

confirmed the high heritabilities previously reported of some platelet-related phenotypes: platelet count, MPV, PCT and PDW. Moreover, we described, for the first time, the high heritabilities of the P-LCR index phenotype, of all the IPF phenotypes and of the platelet function phenotypes obtained with the PFA-100 system. The high heritabilities found for all of the platelet-related phenotypes provide a sound basis for studying the underlying genes of these phenotypes using GWAS. This study is currently in progress in our laboratory within the GAIT-2 Project.

Acknowledgments

We are deeply grateful to all the families that participated in this study and to Siemens Healthcare Diagnostics (Marburg, Germany) that provided technical support. We would like also to thank Professor Bill Stone for reviewing the manuscript.

This work was supported by the following Spanish grants: FIS PI11/0184, FIS PI12/00612, Red Investigación Cardiovascular RD12/0042/0032, and for the following grants from the Generalitat de Catalunya: AGAUR 2009 SGR/1147 and AGAUR 2009 SGR/1240.

References

- J.M. Soria, J. Fontcuberta, New approaches and future prospects for evaluating genetic risk of thrombosis, *Haematologica* 90 (2005) 1212–1222.
- J.C. Souto, L. Almasy, M. Borrell, F. Blanco-Vaca, J. Mateo, J.M. Soria, I. Coll, R. Felices, W. Stone, J. Fontcuberta, J. Blangero, Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia. *Am. J. Hum. Genet.* 67 (2000) 1452–1459.
- P.E. Morange, D.A. Tréguët, Current knowledge on the genetics of incident venous thrombosis, *J. Thromb. Haemost.* 11 (Suppl. 1) (2013) 111–121.
- J.C. Souto, L. Almasy, J. Blangero, W. Stone, M. Borrell, T. Urrutia, J. Mateo, J. Fontcuberta, Genetic regulation of plasma levels of vitamin K-dependent proteins involved in hemostasis: results from the GAIT Project. Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia. *Thromb. Haemost.* 85 (2001) 88–92.
- J.M. Soria, L. Almasy, J.C. Souto, D. Bacq, A. Buil, A. Faure, E. Martínez-Marchán, J. Mateo, M. Borrell, W. Stone, M. Lathrop, J. Fontcuberta, J. Blangero, A quantitative-phenotype locus in the human factor XII gene influences both plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease, *Am. J. Hum. Genet.* 70 (2002) 567–574.
- J.M. Soria, L. Almasy, J.C. Souto, A. Buil, E. Martínez-Sánchez, J. Mateo, M. Borrell, W. Stone, M. Lathrop, J. Fontcuberta, J. Blangero, A new locus on chromosome 18 that influences normal variation in activated protein C resistance phenotype and factor VIII and its relation to thrombosis susceptibility, *Blood* 101 (2003) 163–167.
- J.C. Souto, F. Blanco-Vaca, J.M. Soria, A. Buil, L. Almasy, J. Ordoñez-Llanos, J.M. Martín-Campos, M. Lathrop, W. Stone, J. Blangero, J. Fontcuberta, A genomewide exploration suggests a new candidate gene at chromosome 11q23 as the major determinant of plasma homocysteine levels: results from the GAIT Project, *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005) 925–933.
- Z.S. Kaplan, S.P. Jackson, The role of platelets in atherothrombosis, *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2011 (2011) 51–61.
- F. Müller, T. Renné, Platelet polyphosphates: the nexus of primary and secondary hemostasis, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 71 (2011) 82–86.
- N.J. Mutch, R. Engel, S. Uitte de Willige, H. Philippou, R.A. Ariëns, Polyphosphate modifies the fibrin network and down-regulates fibrinolysis by attenuating binding of tPA and plasminogen to fibrin, *Blood* 115 (2010) 3980–3988.
- E. Ramacciotti, A.E. Hawley, D.M. Farris, N.E. Ballard, S.K. Wroblewski, D.D. Myers Jr., P.K. Henke, T.W. Wakefield, Leukocyte- and platelet-derived microparticles correlate with thrombus weight and tissue factor activity in an experimental mouse model of venous thrombosis, *Thromb. Haemost.* 101 (2009) 748–754.
- M.L. Von Brühl, K. Stark, A. Steinhart, S. Chandraratne, I. Konrad, M. Lorenz, A. Khandoga, A. Tirmicerli, R. Coletti, M. Köllnberger, R.A. Byrne, I. Laitinen, A. Walch, A. Brill, S. Pfeiler, D. Manukyan, S. Braun, P. Lange, J. Riegger, J. Ware, A. Eckart, S. Haidari, M. Rudelius, C. Schulz, K. Echter, V. Brinkmann, M. Schwaiger, K.T. Preissner, D.D. Wagner, N. Mackman, B. Engelmann, S. Massberg, Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo, *J. Exp. Med.* 209 (2012) 819–835.
- J.M. Herter, J. Rossaint, A. Zarbock, Platelets in inflammation and immunity, *J. Thromb. Haemost.* 12 (2014) 1764–1775.
- S.G. Chu, R.C. Becker, P.B. Berger, D.L. Bhatt, J.W. Eikelboom, B. Konkle, E.R. Mohler, M.P. Reilly, J.S. Berger, Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis, *J. Thromb. Haemost.* 8 (2010) 148–156.
- A. Leader, D. Pereg, M. Lishner, Are platelet volume indices of clinical use? A multidisciplinary review, *Ann. Med.* 44 (2012) 805–816.
- S.K. Braekkan, E.B. Mathiesen, I. Njølstad, T. Wilsgaard, J. Størmer, J.B. Hansen, Mean platelet volume is a risk factor for venous thromboembolism: the Tromsø Study, Tromsø, Norway, *J. Thromb. Haemost.* 8 (2010) 157–162.
- H. Cil, C. Yavuz, Y. Islamoglu, E.O. Tekbas, Z.A. Demirtas, Z.A. Atilgan, E. Gündüz, E.D. Benli, H. Tanrıverdi, Platelet count and mean platelet volume in patients with in-hospital deep venous thrombosis, *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 18 (2012) 650–653.
- M. Gulcan, E. Varol, M. Etil, F. Aksoy, M. Kayan, Mean platelet volume is increased in patients with deep vein thrombosis, *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 18 (2012) 427–430.
- E. Günay, S. Sarinc Ulasli, E. Kacar, B. Halici, E. Unlu, K. Tünay, G. Ozkececi, T. Koken, M. Unlu, Can platelet indices predict obstruction level of pulmonary vascular bed in patients with acute pulmonary embolism? *Clin. Respir. J.* 8 (2014) 33–40.
- M. Ergelen, H. Uyarel, Plateletcrit: a novel prognostic marker for acute coronary syndrome, *Int. J. Cardiol.* 177 (2014) 161.
- M. Uğur, E. Ayhan, M. Bozbay, G. Çiçek, M. Ergelen, T. Işık, H. Uyarel, G. Ertaş, Y. Çakılı, A. Öz, M. Keskin, O. Şahin, E.I. Çekirdekçi, M. Eren, The independent association of plateletcrit with long-term outcome in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention, *J. Crit. Care* 29 (2014) 978–981.
- G. De Luca, L. Venegoni, S. Iorio, G.G. Secco, E. Cassetti, M. Verdoia, A. Schaffer, L. Coppo, G. Bellomo, P. Marino, Novara Atherosclerosis Study Group, Platelet distribution width and the extent of coronary artery disease: results from a large prospective study, *Platelets* 21 (2010) 508–514.
- G. De Luca, M. Santagostino, G.G. Secco, E. Cassetti, L. Giuliani, L. Coppo, A. Schaffer, A. Fundaloti, S. Iorio, L. Venegoni, G. Bellomo, P. Marino, Platelet-large cell ratio and the extent of coronary artery disease: results from a large prospective study, *J. Thromb. Thrombolysis* 30 (2010) 426–433.
- E.L. Grove, A.M. Hvas, S.B. Mortensen, S.B. Larsen, S.D. Kristensen, Effect of platelet turnover on whole blood platelet aggregation in patients with coronary artery disease, *J. Thromb. Haemost.* 9 (2011) 185–191.
- F. Cesari, R. Marucci, A.M. Gori, R. Caporale, A. Fanelli, G. Casola, D. Balzi, A. Barchielli, S. Valente, C. Giglioli, G.F. Gensini, R. Abbate, Reticulated platelets predict cardiovascular death in acute coronary syndrome patients. Insights from the AMI-Florence 2 Study, *Thromb. Haemost.* 109 (2013) 846–853.
- F. Cesari, R. Marucci, R. Caporale, R. Panicia, E. Romano, G.F. Gensini, R. Abbate, A.M. Gori, Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy, *Thromb. Haemost.* 99 (2008) 930–935.
- A.L. Frelinger III, M.R. Barnard, M.L. Fox, A.D. Michelson, The Platelet Activity after Clopidogrel Termination (PACT) study, *Circ. Cardiovasc. Interv.* 3 (2010) 442–449.
- D. Mylotte, G.F. Kavanagh, A.J. Peace, A.F. Tedesco, D. Carmody, M. O'Reilly, D.P. Foley, C.J. Thompson, A. Agha, D. Smith, D. Kenny, Platelet reactivity in type 2 diabetes mellitus: a comparative analysis with survivors of myocardial infarction and the role of glycaemic control, *Platelets* 23 (2012) 439–446.
- P. Harrison, I. Mackie, A. Mathur, M.S. Robinson, Y. Hong, J.D. Erusalimsky, S.J. Machin, J.F. Martin, Platelet hyper-function in acute coronary syndromes, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 16 (2005) 557–562.
- J. Gianetti, M.S. Parri, S. Sbrana, F. Paoli, S. Maffei, U. Paradossi, S. Berti, A. Clerico, A. Biagini, Platelet activation predicts recurrent ischemic events after percutaneous coronary angioplasty: a 6 months prospective study, *Thromb. Res.* 118 (2006) 487–493.
- M. Crescente, A.M. Mezzasoma, M. Del Pinto, F. Palmerini, A. Di Castelnuovo, C. Cerletti, G. De Gaetano, P. Gresele, Incomplete inhibition of platelet function as assessed by the platelet function analyzer (PFA-100) identifies a subset of cardiovascular patients with high residual platelet response while on aspirin, *Platelets* 22 (2011) 179–187.
- M.F. Buckley, J.W. James, D.E. Brown, G.S. Whyte, M.G. Dean, C.N. Chesterman, J.A. Donald, A novel approach to the assessment of variations in the human platelet count, *Thromb. Haemost.* 83 (2000) 480–484.
- C. Gieger, A. Radhakrishnan, A. Cvejic, et al., New gene functions in megakaryopoiesis and platelet formation, *Nature* 480 (2011) 201–208.
- G. Biino, I. Santimone, C. Minelli, R. Sorice, B. Frongia, M. Traglia, S. Ulivi, A. Di Castelnuovo, M. Gögele, T. Nutile, M. Francavilla, C. Sala, N. Pirastu, C. Cerletti, L. Iacoviello, P. Gasparini, D. Toniolo, M. Ciullo, P. Pramstaller, M. Pirastu, G. de Gaetano, C.L. Balduino, Age- and sex-related variations in platelet count in Italy: a proposal of reference ranges based on 40987 subjects' data, *PLoS One* 8 (2013) e54289.
- N. Bunimov, N. Fuller, C.P. Hayward, Genetic loci associated with platelet traits and platelet disorders, *Semin. Thromb. Hemost.* 39 (2013) 291–305.
- A.D. Johnson, The genetics of common variation affecting platelet development, function and pharmaceutical targeting, *J. Thromb. Haemost.* 9 (Suppl. 1) (2011) 246–257.
- L. Almasy, J. Blangero, Multipoint quantitative-trait linkage analysis in general pedigrees, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998) 1198–1211.
- M. Boehnke, K. Lange, Ascertainment and goodness of fit of variance component models for pedigree data, *Proc. Clin. Biol. Res.* 147 (1984) 173–192.
- S.G. Self, K. Liang, Asymptotic properties of maximum likelihood estimators and likelihood ratio tests under nonstandard conditions, *J. Am. Stat. Assoc.* 82 (1987) 605–610.
- K. Kaushansky, Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis, *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* (2009) 147–152.
- G. de Gaetano, I. Santimone, F. Gianfagna, L. Iacoviello, C. Cerletti, Variability of platelet indices and function: acquired and genetic factors, *Handb. Exp. Pharmacol.* 210 (2012) 395–434.
- F. Marroni, D. Grazio, C. Pattaro, M. Devoto, P. Pramstaller, Estimates of genetic and environmental contribution to 43 quantitative traits supporting sharing of a homogeneous environment in an isolated population from South Tyrol, Italy, *Hum. Hered.* 65 (2008) 175–182.
- A.M. Fager, J.P. Wood, B.A. Bouchard, P. Feng, P.B. Tracy, Properties of procoagulant platelets: defining and characterizing the subpopulation binding a functional prothrombinase, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 2400–2407.
- L. Vila, A. Martínez-Perez, M. Camacho, A. Buil, S. Alcolea, N. Pujol-Moix, M. Soler, R. Antón, J.C. Souto, J. Fontcuberta, J.M. Soria, Heritability of thromboxane A2 and

- rostaglandin E2 biosynthetic machinery in a Spanish population, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 128–134.
- [45] K. Kario, T. Matsuo, K. Nakao, Cigarette smoking increases the mean platelet volume in elderly patients with risk factors for atherosclerosis, *Clin. Lab. Haematol.* 14 (1992) 281–287.
- [46] S. Badrya, R. Baumgartner, A. Assinger, Smoking alters circulating plasma microvesicle pattern and microRNA signatures, *Thromb. Haemost.* 112 (2014) 128–136.
- [47] A. Rank, R. Nieuwland, K. Nikolajek, S. Rösner, L.M. Wallwiener, E. Hiller, B. Toth, Hormone replacement therapy leads to increased plasma levels of platelet derived microparticles in postmenopausal women, *Arch. Gynecol. Obstet.* 285 (2012) 1035–1041.
- [48] P.H. Cutini, A.E. Campelo, E. Agriello, M.J. Sandoval, M.B. Rauschemberger, V.L. Massheimer, The role of sex steroids on cellular events involved in vascular disease, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 132 (2012) 322–330.

Estudio #2

Resultados suplementarios

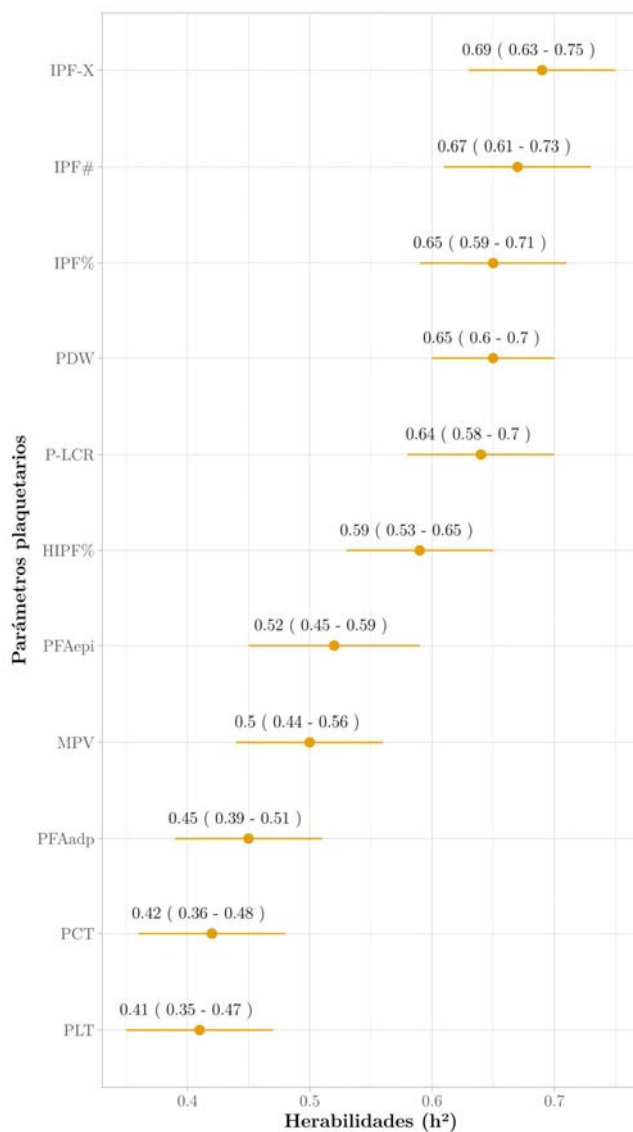


Figura 3.4: Heredabilidades (h^2), obtenidas en el proyecto GAIT 2, para los parámetros plaquetarios. En la figura se observa una ordenación de menor a mayor h^2 . En ella se puede observar como los parámetros de inmadurez plaquetaria tienen una mayor determinación genética que los parámetros de recuento plaquetario.

Estudio #3

**Platelet Count and Plateletcrit are Associated with an
Increased Risk of Venous Thrombosis in Females.
Results from the RETROVE Study**

Introduction

Several studies have associated the risk of venous thromboembolism (VTE) with elevated platelet counts [1,2] and mean platelet volume (MPV) [2,3]. A previous study identified an elevated platelet count over $350 \cdot 10^9/L$ as an independent risk of VTE with an odds ratio (OR) of 2.5 and 95% confidence interval (CI) of 1.3–4.8 [1]. Also, the Tromsø study [3] identified the MPV as a predictor of VTE risk with a hazard ratio (HR) of 1.3 and 95% CI of 1.0–1.7, especially in unprovoked VTE risk with a HR of 1.5 and 95% CI of 1.1–2.3. The main aim of our study was to evaluate the thrombotic risk in patients with VTE using platelet counts and platelet indices.

Material and Methods

We performed an analysis based on a case–control study. RETROVE (Riesgo de Enfermedad TROMboembólica VENosa) is a prospective case–control study that includes 400 adult patients (over 18 years) with VTE and 400 healthy control volunteers, according to the age and sex distribution of the Spanish population (2001 census). Our study was performed in accordance with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki.

A 5 ml blood sample was obtained in the anti–coagulant (BD Vacutainer Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA) containing EDTA. Samples from the 400 patients were taken at 6 months after thrombosis. None of the participants was using oral anticoagulants, heparin or antiplatelet therapy at the time of blood collection. The platelet counts (PLT and PLTOP), plateletcrit (PCT), MPV, platelet distribution width (PDW) and platelet–large ratio cell (P–LCR) were determined within 2 hours after the blood extraction using an automated haematological analyser Sysmex XE–2100® (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), as previous described [4].

The Chi-square and the non-parametric Mann-Whitney tests were used to compare pairs of categorical variables (**Supplementary Table 1**) and differences between the mean values of platelet parameters. An unconditional logistic regression analysis was used to calculate the VTE risk. For the platelet parameters, values over the 90th percentile were considered as risk factors. Also, we identified the individuals with 3 platelet parameters (PLT, PLTOP and PCT) over 90th percentile and designated as redundant platelet number parameter (RPNP). Using the Bayesian Information Criterion (BIC) [5], we found that age, gender, body mass index (BMI), hypertension, risk levels of VIII (FVIII) and von Willebrand (vWF) factors (over 216% and 183%) were potential confounders. For this reason, we analysed the VTE risk using three models: Model 1, model adjusted only by age and gender and; Model 2, model adjusted by all the potential confounders, as well as by ABO blood group system (group O versus non-O). We performed also a sex-specific analysis, taking into account the distribution of the controls of each gender. The detailed material and methods section are included as supplemental material.

Results

There are statistically significant differences between patients and controls for age groups, BMI over normal values, alcohol consumption, hypertension, dyslipidaemia and diabetes mellitus (**Supplementary Table 1**). We observed more spontaneous ($n = 273$, 68.3%) versus non-spontaneous VTE ($n = 127$, 31.8%), as shown in **Supplementary Table 2**. We did not find significant differences between patients and controls for the means of each of these 6 platelet parameters (**Supplementary Table 3**).

We focused on PLT, PLTOP, PCT in the three models previously described (**Table 1**). In Model 1, only the RPNP resulted in a

significant OR of 1.97 within the 95% CI of 1.16–3.39. In Model 2, the PLT (OR = 1.70), PCT (OR = 1.67) and RPNP (OR = 1.96) over 90th percentile showed significant p-values for the thrombotic risk.

In females but not in males, PLT, PLTOP and PCT were associated with thrombotic risk in Model 1 and 2 (**Table 1** and **Figure 1**). The OR between the two models is similar: for PLT 2.18 and 2.33, for PLTOP 1.98 and 2.07, for PCT 2.19 and 2.22 and for RPNP 2.57 and 2.69. The remaining platelet parameters (MPV, PDW and P-LCR) did not show any significant odds ratios (OR) in any model (**Supplementary Table 4**).

Discussion

The platelet count is a parameter that is widely used to determine the thrombopoietic status of individuals. In healthy population, the platelet counts decrease with age and females show higher counts than males. Several studies [4,6] reported a normal platelet counts range from 150 to 400 · 10⁹/L of whole blood and, found the difference due to gender was between 21 and 34 · 10⁹/L. Thus, we investigated the role of PLT, PLTOP and PCT as risk factors for VTE. Our results indicated that high values of these parameters are related to increased VTE risk, especially in females, but we did not find this relationship in males. The RPNP showed even a stronger association with the VTE risk.

In the RETROVE Study, demographic variables differences may be due to the fact that the patients were older than the controls and also to the particular design of the RETROVE Study [7]. The high prevalence of spontaneous VTE (68.3%) versus non-spontaneous (31.8%) may be due to the increasing use of pharmacological VTE prophylaxis in patients with thrombotic risk, in patients who had surgical procedures or patients with long immobilization periods.

In our patients, the VTE risk was greater when the PLT was over $302 \cdot 10^9/L$, in Model 2. Moreover, the VTE risk was similar when the PCT was over 0.32%, in the Models 1 and 2. For these parameters, we found a risk of VTE after adjusting for age and gender (Model 1). However, for the PLTOP, there are no association with the VTE risk. Several studies [1,3] reported different results for the PLT parameter. Nevertheless, we observed an increase in the VTE risk, in all of our models, when the RPNP was over the 90th percentile (**Table 1** and **Figure 1**).

A previous study [8] reported that the incidence of VTE is higher in females than in males. In our study, the sex-specific analysis found that elevated values in the PLT (over $312 \cdot 10^9/L$), PLTOP (over $317 \cdot 10^9/L$) and PCT (over 0.33%) are associated with an increased risk of VTE, in the Models 1 and 2. Our OR values were consistent with those reported in a previous study [1], that have an OR of 2.6 (95% CI 1.3–5.5) for PLT values over $350 \cdot 10^9/L$. Also, studies [2] with oncologic patients reported similar OR. However, a study [9] in patients with heparin prophylaxis reported higher PLT values (over $500 \cdot 10^9/L$) than what we found.

Finally, these platelets parameters showed the highest VTE risk in Model 2 (**Table 1**). It is possible that the increased risk of VTE in patients with elevated platelet counts is mediated by the FVIII. The FVIII stimulates the platelet adhesion and aggregation, processes that contribute to stimulate prothrombosis [10].

Conclusion

In the RETROVE Study, we observed a high prevalence of spontaneous VTE versus non-spontaneous. Moreover, elevated platelet counts (even within the reference clinical range) were associated with a high risk of VTE, especially in our female patients. Our findings support the concept that elevated platelet counts play an

important role in the pathogenesis of VTE. We believe that our results will provide a firm foundation for additional studies and ultimately find a place in clinical practice.

Acknowledgements

The authors thank the individuals who participated in the RETROVE Study. We would like to thank also Professor Bill Stone for reviewing the manuscript.

This work was supported in part by the Spanish grants: Red Investigación Cardiovascular RD12/0042/0032, FIS PI 12/0612 and FIS PI 15/0269.

Declarations of Interest

The authors report no conflicts of interest.

References

- [1] N.A. Zakai, J. Wright, M. Cushman, Risk factors for venous thrombosis in medical inpatients: validation of a thrombosis risk score., *J. Thromb. Haemost.* 2 (2004) 2156–61. doi:10.1111/j.1538-7836.2004.00991.x.
- [2] S. Montoro-García, M. Schindewolf, S. Stanford, O.H. Larsen, T. Thiele, The Role of Platelets in Venous Thromboembolism, *Semin. Thromb. Hemost.* 42 (2016) 242–51. doi:10.1055/s-0035-1570079.
- [3] S.K. Braekkan, E.B. Mathiesen, I. Njølstad, T. Wilsgaard, J. Størmer, J.B. Hansen, Mean platelet volume is a risk factor for venous thromboembolism: the Tromsø Study, Tromsø, Norway., *J. Thromb. Haemost.* 8 (2010) 157–62. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03498.x.
- [4] M. Vázquez-Santiago, A. Ziyatdinov, N. Pujol-Moix, H. Brunel, A. Morera, J.M. Soria, J.C. Souto, Age and gender effects on 15 platelet phenotypes in a Spanish population, *Comput. Biol. Med.* 69 (2016) 226–233. doi:10.1016/j.combiomed.2015.12.023.
- [5] J.K. Kruschke, Metric Predicted Variable with Multiple Nominal Predictors, in: *Doing Bayesian Data Anal.*, 2n. Ed., Academic Press, London, 2015: pp. 583–620.
- [6] A. Sloan, P. Gona, A.D. Johnson, Cardiovascular correlates of platelet count and volume in the Framingham Heart Study, *Ann. Epidemiol.* 25 (2015) 492–498. doi:10.1016/j.annepidem.2015.01.010.
- [7] P. Prandoni, F. Bilora, A. Marchiori, E. Bernardi, F. Petrobelli, A.W. Lensing, M.H. Prins, A. Girolami, An association between atherosclerosis and venous thrombosis., *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 1435–41. doi:10.1056/NEJMoa022157.
- [8] I.A. Naess, S.C. Christiansen, P. Romundstad, S.C. Cannegieter, F.R. Rosendaal, J. Hammerstrom, Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study, *J. Thromb. Haemost.* 5 (2007) 692–699. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02450.x.
- [9] R. Dahan, D. Houlbert, C. Caulin, E. Cuzin, C. Viltart, M. Woler, J.M. Segrestaa, Prevention of deep vein thrombosis in elderly medical in-

patients by a low molecular weight heparin: a randomized double-blind trial., *Haemostasis*. 16 (1986) 159–64.

[10] P.W. Kamphuisen, J.C. Eikenboom, R.M. Bertina, Elevated factor VIII levels and the risk of thrombosis., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 731–738. doi:10.1161/01.ATV.21.5.731

Tables and Supplementary Tables

Table 1: *Odds ratio* of venous thromboembolism (VTE) events, taking into account the 90th percentile of controls, for each platelet counts and platelecrit in the RETROVE Study.

	Interval*	p*	c*	Model 1 [†]		Model 2 ^{††}	
				OR (95% CI)	p-value [ⓐ]	OR (95% CI)	p-value [ⓐ]
Total (800)							
PLT ($\times 10^9/L$)	[302–657]	54	41	1.61 (1.02–2.58)	0.043	1.70 (1.04–2.79)	0.034
PLTOP ($\times 10^9/L$)	[313–725]	53	40	1.59 (0.99–2.55)	NS	1.6 (0.97–2.67)	NS
PCT (%)	[0.32–0.64]	61	44	1.69 (1.09–2.65)	0.020	1.67 (1.04–2.68)	0.034
RPNP	–	43	27	1.97 (1.16–3.39)	0.013	1.96 (1.11–3.48)	0.021
Females (410)							
PLT ($\times 10^9/L$)	[312–480]	44	29	2.18 (1.26–3.83)	0.006	2.33 (1.29–4.23)	0.005
PLTOP ($\times 10^9/L$)	[317–474]	45	30	1.98 (1.15–3.45)	0.015	2.07 (1.15–3.74)	0.015
PCT (%)	[0.33–0.47]	47	30	2.19 (1.28–3.82)	0.005	2.22 (1.25–3.99)	0.007
RPNP	–	35	19	2.57 (1.37–4.95)	0.004	2.69 (1.38–5.34)	0.004
Males (390)							
PLT ($\times 10^9/L$)	[282–657]	10	12	0.81 (0.33–1.98)	NS	0.89 (0.35–2.22)	NS
PLTOP ($\times 10^9/L$)	[288–725]	8	10	0.83 (0.30–2.21)	NS	0.85 (0.30–2.33)	NS
PCT (%)	[0.30–0.64]	14	14	1.03 (0.46–2.27)	NS	1.00 (0.43–2.29)	NS
RPNP	–	8	8	1.04 (0.37–2.95)	NS	1.00 (0.34–3.92)	NS

Odds ratio (OR) models within the 95% confidence intervals (CI) in parentheses: (†) adjusted for age and gender (††) adjusted for age, gender, body mass index (BMI), hypertension and risk levels (greater than the 90th percentile of controls) of the VIII and von Willebrand factors, as well as ABO blood group system (group O *versus* non-O).

(*) Number of individuals analysed over the 90th percentile sorted by (p) patients and (c) controls. The number of excluded individuals by technical issues is shown in parentheses in Supplementary Table 3.

([ⓐ]) The statistical significances are fixed in a *p-value* < 0.05. The non-significance is shown as NS

Supplementary Table 1: Clinical characteristics for patients and controls of the RETROVE Study.

Baseline Characteristics					
	Patients		Controls		p-values ^g
	Males	Females	Males	Females	
Number	196	204	194	206	NS
Age*					
Adulthood–group 1 (18–64)	117 (59.7)	82 (40.2)	158 (81.4)	156 (75.7)	$< 2.2 \cdot 10^{-16}$
Elders–group 2 (65–94)	79 (40.3)	122 (59.8)	36 (18.6)	50 (24.3)	$< 2.2 \cdot 10^{-16}$
Body mass index (BMI)[†]					
Normal (< 25)	52 (26.5)	63 (30.9)	89 (45.9)	117 (56.8)	$7.44 \cdot 10^{-11}$
Overweight (25–30)	91 (46.4)	73 (35.8)	75 (38.7)	68 (33.0)	NS
Obesity (> 30)	53 (27.0)	66 (32.3)	30 (15.5)	21 (10.2)	$3.3 \cdot 10^{-9}$
Smoking	37 (18.9)	18 (8.8)	40 (20.6)	35 (17.0)	NS
Alcohol intake	119 (60.7)	76 (34.3)	130 (67.0)	98 (47.6)	0.019
Hypertension	83 (42.3)	94 (46.1)	35 (18.0)	40 (19.4)	$8.27 \cdot 10^{-15}$
Dyslipidaemia	62 (31.6)	75 (36.8)	36 (18.6)	43 (20.9)	$3.46 \cdot 10^{-6}$
Diabetes mellitus	23 (11.7)	17 (8.3)	10 (5.2)	10 (4.9)	0.0073
Autoimmune disease	20 (10.2)	21 (10.3)	14 (7.2)	18 (8.7)	NS.
Thrombosis[#]	98 (50)	115 (56.4)	98 (50.5)	127 (61.7)	NS

Number of individuals for each group. The percentages are given in parentheses.

(*) The intervals of age are given in parentheses (years).

(†) Two individuals are excluded by technical issues. The intervals are given in parentheses (kilograms per square meters).

(#) Familiar thrombosis background.

(^g) The statistical differences, fixed in a *p-value* < 0.05 , are reported only for descriptive purposes. The not–significance is shown as NS.

Supplementary Table 2: Characteristics of first thrombotic events characteristics in the RETROVE Study.

	Spontaneous			Non-spontaneous		
	Males*	Females*	Total†	Males*	Females*	Total†
Isolated deep vein thrombosis	82 (56.2)	63 (49.6)	145 (53.1)	27 (54.0)	38 (49.4)	65 (51.2)
No isolated deep vein thrombosis	30 (20.6)	19 (15.0)	49 (18.0)	10 (20.0)	11 (14.3)	21 (16.5)
Isolated pulmonary embolism	31 (21.2)	42 (33.1)	73 (26.7)	12 (24.0)	26 (33.8)	38 (29.9)
Visceral thrombosis	2 (1.4)	–	2 (0.7)	1 (2.0)	–	1 (0.8)
Venous sinus thrombosis	1 (0.7)	3 (2.4)	4 (1.5)	–	2 (2.6)	2 (1.6)
Total#	146 (36.5)	127 (31.8)	273 (68.3)	50 (12.5)	77 (19.3)	127 (31.8)

The percentages are given in parentheses.

(*) The percentages are obtained from the number of thrombosis types divided into the total number of males or females.

(†) The percentages are obtained from the number of thrombosis types divided into the total number of spontaneous or non-spontaneous events.

(#) The percentages were obtained from the number of male, female or total divided into the total number of patients or controls.

Supplementary Table 3: Descriptive statistics for the platelet parameters in the RETROVE Study.

	Patients		Controls		p-values [ⓐ]
	n*	Mean ± SD [#]	n*	Mean ± SD [#]	
PLT ($\times 10^9/L$)	396 (4)	237 ± 55	400	236 ± 67	NS
PLTOP ($\times 10^9/L$)	389 (11)	242 ± 57	398 (2)	243 ± 70	NS
PCT (%)	396 (4)	0.27 ± 0.05	400	0.25 ± 0.07	NS
MPV (fL)	396 (4)	8.4 ± 0.9	400	8.4 ± 1.0	NS
PDW (%)	396 (4)	13.5 ± 2.0	400	13.4 ± 2.0	NS
P-LCR (%)	389 (11)	32.4 ± 7.5	394 (6)	32.2 ± 7.8	NS

The PLT and PLTOP are given $\times 10^9/L$. The PCT and P-LCR are given in percentages. The MPV and PDW are given in femtoliters (fL).

(*) Number of the individuals. The number of excluded individuals by technical issues is shown in parentheses.

(#) Means of platelet parameters and standard deviations (SD).

(ⓐ) The statistical significances for the Mann-Whitney test are fixed in a p-value < 0.05. The non-significance is shown as NS.

Supplementary Table 4: Odds ratio of the venous thromboembolism (VTE) risk, taking into account the 90th percentile of controls, for each platelet volume parameters in the RETROVE Study.

	Interval*	p*	c*	Model 1 [†]		Model 2 ^{††}	
				OR (95% CI)	p-value [Ⓐ]	OR (95% CI)	p-value [Ⓐ]
Total (800)							
MPV (fL)	[9.6–11.8)	48	40	1.06 (0.66–1.70)	NS	0.98 (0.59–1.64)	NS
PDW (fL)	[16.0–23.8)	56	41	1.25 (0.79–1.97)	NS	1.26 (0.78–2.05)	NS
P-LCR (%)	[42.0–58.7)	47	40	1.05 (0.66–1.69)	NS	1.04 (0.62–1.74)	NS
Females (410)							
MPV (fL)	[9.6–11.6)	21	22	0.87 (0.44–1.71)	NS	0.69 (0.32–1.46)	NS
PDW (fL)	[15.6–23.0)	22	17	1.23 (0.60–2.53)	NS	1.19 (0.56–2.53)	NS
P-LCR (%)	[41.8–57.1)	21	21	0.94 (0.47–1.87)	NS	0.87 (0.41–1.80)	NS
Males (390)							
MPV (fL)	[9.6–11.8)	27	18	1.32 (0.69–2.57)	NS	1.40 (0.68–2.91)	NS
PDW (fL)	[16.2–23.8)	34	24	1.29 (0.72–2.33)	NS	1.30 (0.68–2.50)	NS
P-LCR (%)	[42.3–58.7)	26	19	1.20 (0.63–2.32)	NS	1.28 (0.61–2.71)	NS

Odds ratio (OR) models within the 95% confidence intervals (CI) in parentheses: (†) adjusted for age and gender (††) adjusted for age, gender, body mass index (BMI), hypertension and risk levels (greater than the 90th percentile of controls) of the VIII and von Willebrand factors, as well as ABO blood group system (group O versus non-O).

(*) Number of individuals analysed over the 90th percentile sorted by (p) patients and (c) controls. The number of excluded individuals by technical issues is shown in parentheses in Supplementary Table 3.

(Ⓐ) The statistical significances are fixed in a *p-value* < 0.05. The non-significance is shown as NS.

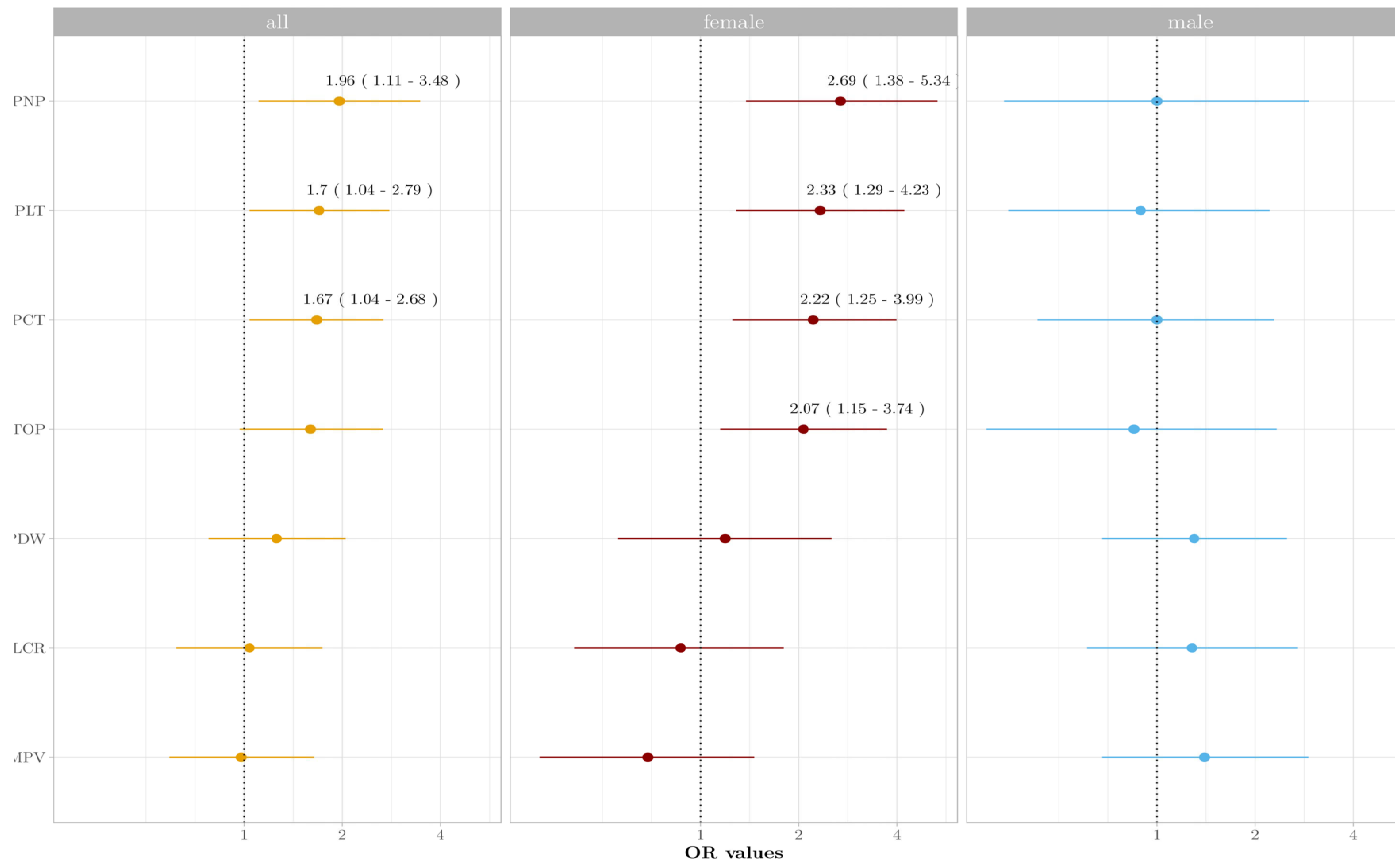


Figure 1 Risk of venous thromboembolism (VTE) for 6 platelet parameters and RPNP in the sample (left), females (centre) and males (right) following Model 2. The *odds ratio* (OR) and the 95% confidence intervals (CI) with significant p-values are shown for the platelet counts (PLT, PLTOP and RPNP) and plateletcrit (PCT). The rest of the OR and the 95% CI are shown in Table 1 and Supplementary Table 4. The statistical significance of lower CI is fixed in 1.0, as indicated by the vertical broken line. La imagen corresponde a la **Figura 3.5** del presente trabajo.

Estudio #4

**Short Closure Time Values in PFA-100® Are Related
with Venous Thrombotic Risk. Results from the
RETROVE Study**

Introduction

Venous thromboembolism (VTE) consists in Deep Vein Thrombosis (DVT) and Pulmonary Embolism (PE) and constitutes a leading cause of morbidity and mortality [1,2]. Platelets, together with endothelial cells and circulating coagulation proteins, are crucial mediators of vascular haemostasis and, therefore, they play an important role in VTE.

The relevance of platelets in the pathophysiology of thrombosis is well established [3]. Injury in the endothelium leads to exposure of the circulating blood cells to collagen from the subendothelial space. Platelets, through their glycoproteins (GP) GPVI and GPIb/V/IX, interact with collagen and the von Willebrand factor (vWF) [4]. Collagen exposure leads to platelet adhesion and the formation of a platelet monolayer. Activated platelets recruit other circulating platelets, coagulation factors and other cell types by secreting aggregatory mediators. Deep tissue damage leads to the release of tissue factor (TF) that mediates the conversion of prothrombin to thrombin, fibrin generation, and clotting [5].

An initial approach to assess platelet function begins with an appropriate clinical evaluation, platelet counts and the observation of peripheral blood cell morphology. Further laboratory testing includes platelet function assays and vWF analyses [6].

Generally, different methodologies are employed to evaluate platelet function such as bleeding time (BT), light transmission aggregometry on platelet rich plasma (PRP) or impedance aggregometry on whole blood [7]. Later, the PFA-100[®] analyser (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) become a useful in vitro assay for the evaluation of overall platelet function [8-10].

The PFA-100[®] simulates a vessel wall under physiologic shear stress conditions. The device contains a membrane coated with collagen and also with ADP (PFAadp) or with epinephrine (PFAepi). This membrane has a hole through which the anticoagulated blood passes. The presence of these agonists and the high shear rates results in platelet adhesion, activation and aggregation, and finally forming a stable platelet plug which occludes the hole. The time required to occlude the hole, in seconds, is reported as closure time (CT) and it is inversely proportional to the functional capacity of platelets [8].

The Multiplate[™] analyser (Roche Diagnostics International Ltd., Rotkreuz, Switzerland) is a multiple electrode impedance aggregometer that assesses platelet aggregation in whole blood [11,12]. This method is based on the attachment of platelets to two platinum electrodes, resulting in an increase of electrical resistance between the electrodes. The change of resistance or impedance is continuously recorded and it is proportional to the amount of platelets stuck in the electrodes.

Several studies have attempted to develop models for predicting thrombogenicity and thrombus formation. The complex mechanisms behind high shear rate thrombus occlusion have been investigated by Mehrabadi *et al* [13]. By using platelet function analyser, the PFA-100[®], they developed a model for thrombus formation at high shear rates to predict thrombus growth and occlusion times.

Recently the Framingham Heart Study has published results about baseline aggregability and VTE risk. They found a weak correlation between platelet reactivity and VTE [14]. However, these results are inconsistent with other clinical studies that reported an exaggerated platelet aggregation response to platelet agonists in patients with VTE [15,16].

Considering the hypothesis of a relationship between platelet hyperreactivity and VTE, the aim of the present study is to investigate the role of the platelet function analysis, by means of PFA-100® and Multiplate™ parameters, in the assessment of VTE risk.

Material and Methods

Study Sample

Individuals were recruited from the RETROVE Study (Riesgo de Enfermedad TROMboembólica VEnosa) at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau of Barcelona (Spain) between 2012 and 2016. RETROVE is a prospective case-control study which included 400 consecutive adult patients (over 18 years) with VTE (according to specific clinical inclusion criteria) and 400 healthy volunteers who serve as controls. Detailed population baseline characteristics are described in **Table 1**. The goals of the RETROVE Study were to identify new biomarkers for VTE and to establish mathematical algorithms to predict the risk of thrombosis.

The diagnosis of thrombosis was based on doppler ultrasonography, tomography, magnetic resonance, arteriography, phlebography and pulmonary gammagraphy. Any type of thrombosis was included except those related to cancer. As detailed in **Table 2**, a VTE event was classified as either unprovoked or spontaneous or provoked or non-spontaneous (one or more provoking factors within three months previous to a recognised event) [17,18]. In this last group, provoking factors were: surgery, immobilization, pregnancy or puerperium, oral contraceptives, prothrombotic non-neoplastic diseases and other circumstances. For the control group, 400 healthy individuals (non-related with cases and neither among them) were included and they were distributed according to the age and gender distribution of the Spanish population (2001 census).

Our study was performed in accordance with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all of the participants and all of the procedures were approved by the Institutional Review Board at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Blood Collection

The patient group, samples were taken 6 months after thrombosis. None of the participants was took oral anticoagulants in the previous 21 days, heparin in the previous 36 hours or antiplatelet therapy or non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the previous week at the time of blood collection. Blood samples for PFA analysis were collected from antecubital vein between 9:00 a.m. and 12:00 p.m., under basal conditions and after 12-hour overnight fasting. Blood was drawn into 4.5 ml tubes that contained a 3.8% solution of sodium citrate as anticoagulant (BD Vacutainer Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA). To determine platelet aggregometry all samples were collected in tubes containing hirudin 25 µg/ml (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). It was mandatory that the hirudin and citrated whole blood samples were analysed between 15 minutes and two hours after blood sampling.

To measure plasma parameters, blood samples were collected with 1/10 volume of sodium citrate 0.13 M (BD Vacutainer Becton, Dickinson). The vWF and factor VIII (FVIII) levels were measured immediately after blood extraction. PRP was obtained by centrifugation at 2000g for 20 minutes and stored at -20 °C until analysed. For the blood group genotyping, DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by a standard protocol [19].

Measurement of Parameters

For the PFA analysis, the citrated whole blood sample was transferred into the reservoir of the disposable test cartridges

(PFAadp and PFAepi), already inserted in the instrument, and both CT were recorded. Our normal references ranges were comprised from 58 to 123 seconds, for the PFAadp and, from 72 to 191 seconds, for the PFAepi.

For Multiplate™ analysis, whole blood was added to the test cuvettes, stirred and warmed up to 37 °C, and, then the following aggregation values were recorded: area under the curve (AUC), maximum height of the aggregation (AGR) and maximum slope of the curve (SLP). Two different concentrations of the agonist ADP were used (ADP-test): 0.25 µM and 0.5 µM. The AGR values of at least 60% was considered as normal aggregation according to our Multiplate™ reference standards.

The FVIII activity was measured by STA®-ImmunoDef FVIII (Stago, Asnières sur Seine, France) coagulometric method. The vWF levels were measured by ELISA. The blood group genotyping was performed by PCR and subsequent enzyme digestion, as previously described [20].

Descriptive Statistical Analysis

An unconditional logistic regression analysis was used to calculate the VTE risk. For the PFAadp and PFAepi, values under the 10th percentile were considered risk factors. Also, we identified the individuals with both PFA parameters under 10th percentile. In addition, we created a new parameter called redundant platelet function assay (RPFA). For the Multiplate™ parameters, values over the 90th percentile were considered risk factors. According to previous studies [21–23] there are potential confounders that can introduce bias in determining risk factors for venous and arterial thrombosis. We used the Bayesian Information Criterion (BIC) to identify them. For venous thrombosis, we found that age, gender and risk levels of FVIII and vWF (over 216% and 183%) were potential

confounders. As published previously [24,25], the ABO locus has functional effects on vWF and FVIII, thus, we also considered the non-O blood group as potential confounder. For arterial thrombosis we found that the age, gender and body mass index (BMI) were potential confounders.

Due to the potential effects of the confounders, we built four final unconditional logistic regression models for each parameters. The VTE risk models were: 1) the unadjusted model (Model1); 2) model adjusted only by age and gender (Model2); 3) model adjusted by age, gender and vWF (Model 3) and; 4) model adjusted by all the potential venous or arterial thrombosis confounders, for either PFA or Multiplate™, respectively (Model 4). All the variables included in any of the models are detailed in the **Supplementary Table 1**.

Results

Clinical Characteristics in the RETROVE Study

The baseline characteristics of patients and controls are summarized in **Table 1**. The characteristics of the inclusion thrombotic events, according to spontaneous vs non-spontaneous location are shown in **Table 2**.

The descriptive statistics of the PFA and Multiplate™ parameters are summarized in **Table 3**. Only in the PFA parameters we found significant differences between patients and controls. For the PFAadp, the patient group (77 ± 20.5 s) showed shorter CT values than the control group (86 ± 19.3 s), with a significant p-value of $3.38 \cdot 10^{-16}$. Also, for the PFAepi, the patient group (110 ± 30 s) showed shorter CT values than control group (147 ± 33.2), with a significant p-value ($1.15 \cdot 10^{-17}$).

PFA Parameters and VTE Risk

To assess whether there was an association between CT and VTE risk we stratified the sample into 4 groups (10th, 20th, 30th and 50th percentiles of the control distribution), as shown in **Supplementary Table 2**. Significant differences below the 20th percentile for PFAadp and below 50th percentile for PFAepi were founded. As shortest the CT is, the *odds ratio* (OR) of thrombosis risk increases.

For the PFAadp (**Figure 1a**), the VTE risk was associated to CT values lower than 72 seconds (20th percentile), while for PFAepi the risk was associated with CT values lower than 120 seconds (50th percentile) (**Figure 1b**).

PFA Parameters and the VTE Risk under 10th Percentile

For the Model 1, the ORs were significant for PFAadp, PFAepi and RPFA (4.02, 3.33 and 5.17, respectively). The ORs remained significant when the PFA parameters were adjusted by age and gender (Model 2): 3.49 for PFAadp, 2.88 for PFAepi and 4.26 for RPFA. When we added vWF (a protein that contributes in platelet adhesion and aggregation) the ORs decreased but they still remained significant: 2.18 for PFAadp, 1.64 for PFAepi and 2.54 for RPFA. Finally, the Model 4 identified VTE risk for all parameters (**Table 4**).

MultiplateTM parameters and VTE Risk over 90th Percentile

The MultiplateTM parameters (AUC 0.25 μ M, AUC 0.5 μ M, AGR 0.25 μ M, AGR 0.5 μ M, SLP 0.25 μ M and SLP 0.5 μ M) did not show any significant OR in any of the models, as shown in **Table 4** and **Figure 2**.

Discussion

In the classical view of thrombotic events, platelets are considered to play a pivotal role in arterial thrombosis. However, arterial thrombosis and venous thrombosis are related and share common

risk factors, such as the platelet hyperreactivity [26]. Several studies have discussed that the elevated platelet reactivity may be due to an increased platelet adhesion, activation and/or aggregation [14–16,27]. Widely used analysers to assess the platelet function in the clinical practice are the PFA–100® and Multiplate™ [7,10,9].

Several studies have been reported normal ranges for the PFA–100® analyser cartridges [9,28–30]. Our results also have shown normal values for both PFA parameters (**Figures 1a** and **1b**). Although being within normal limits for these parameters, the VTE risk was higher when the CT values were lower than 10th percentile, in all the models. Both PFA parameters are above the normal ranges, as shown in Figures 1a and 1b. Especially for these parameters, the VTE risk was greater when the CT values were lower than 10th percentile, in all the models. For the PFAadp and PFAepi, the VTE risk increased when the CT values are lower than 66 seconds and 93 seconds, respectively. Also, these risks were maintained after adjusting the model for age and gender (Model 2) in both PFA parameters. For these parameters, the OR decreased only after adjusting for potential confounders of venous thrombosis (Model 3 and 4 vs Model 1). Additionally, the RPFA parameter showed a similar decrease in OR values after adjusting for age and gender, as shown in **Figure 2**.

In the Model 3, the vWF (over 183%), used as confounder, may explain the lower VTE risk for the PFA parameters. Also, the presence of the vWF, as well as the FVIII (over 216%) and non-O blood group may be explain the decrease of the VTE risk in Model 4. Some studies have reported that the FVIII stimulate an increased platelet adhesion and aggregation via thrombin and vWF. In addition, it is well known that the blood ABO system, acting through elevated vWF, explain about 30% of the genetic variation in FVIII levels [22,31]. Thus, the relationship between FVIII, vWF and

blood non-O group may explain in part the decreased VTE risk in PFA parameters when such confounders are taken in to consideration.

Higher aggregability is the way of platelets to react more strongly than normal during an in vitro response to low levels of platelet agonists [32]. Several studies have been associated the VTE risk in response to low-doses of TRAP-6 or collagen [14,16]. Especially, the collagen lag time have been associated with the increased VTE risk with a hazard ratio (HR) of 1.01 (95% CI, 1.00–1.02) [14]. However, we did not perform aggregometry stimulated with thrombin or collagen, thus we cannot compare our results with those of previous studies [15,16].

Despite of previous studies [13, 15], our results of aggregometry in whole blood, using (0.25 μ M) and high (0.5 μ M) doses of ADP, did not show any association with VTE risk (Figure 2), according to others reported [14,16]. Our studies on the relation between platelet function and risk of VTE have provided different results depending to the measurement method. Using PFA-100[®] analyser we have clearly find that low CT values are associated with VTE risk, even within the normal intervals. However, when using whole blood aggregometry, we did not found any relation with VTE risk. A plausible explanation for this difference could be that in PFA-100[®] analyser platelets adhere to a membrane before they aggregate, while in Multiplate[™] analyser platelets are in suspension and only aggregate, as several studies reported [7,10].

The PFA-100[®] analyser was developed and largely used for the diagnosis of bleeding disorders such as von Willebrand disease or thrombopathies [30]. However, our study strongly suggests that this method may be also useful in the field of thrombosis.

A methodological issue in our study needs to be addressed. Specifically, the parameters were measured at least six months after the thrombotic event. We cannot be sure if our results would have been different if we had studied patients during the acute phase.

Conclusion

In our analysis, we investigated the role of PFA and Multiplate™ parameters as risk factors for VTE. Our results reported that the VTE risk increases with shortest CT for PFAadp and PFAepi. Especially, shorter CT values for the PFA parameters (even within the reference clinical range) were associated with a high risk of VTE. However, elevated values for the Multiplate™ parameters were not associated with a risk of VTE. Our findings suggest that the concept an elevated adhesion function, but not hyperaggregability, play an important role in the pathogenesis of VTE. We believe that our results will provide a firm foundation for additional studies and ultimately find a place in clinical practice.

Acknowledgements

The authors thank the individuals who participated in the RETROVE Study. The authors thank (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) for the technical support. We would like to thank also Professor Bill Stone for reviewing the manuscript.

This work was supported in part by the Spanish grants: Red Investigación Cardiovascular RD12/0042/0032, FIS PI 12/0612 and FIS PI 15/0269.

Declarations of Interest

The authors report no conflicts of interest.

References

- [1] M. Nordström, B. Lindblad, D. Bergqvist, T. Kjellström, A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population., *J. Intern. Med.* 232 (1992) 155–160.
- [2] J.C. Souto, L. Almasy, M. Borrell, F. Blanco-Vaca, J. Mateo, J.M. Soria, I. Coll, R. Felices, W. Stone, J. Fontcuberta, J. Blangero, Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia., *Am. J. Hum. Genet.* 67 (2000) 1452–9. doi:10.1086/316903.
- [3] A.T. Franco, A. Corken, J. Ware, Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer., *Blood.* 126 (2015) 582–8. doi:10.1182/blood-2014-08-531582.
- [4] B. Savage, E. Saldívar, Z.M. Ruggeri, Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor., *Cell.* 84 (1996) 289–97.
- [5] M. Koupenova, B.E. Kehrel, H.A. Corkrey, J.E. Freedman, Thrombosis and platelets: an update., *Eur. Heart J.* (2016) ehw550. doi:10.1093/eurheartj/ehw550.
- [6] S.J. Israels, Laboratory testing for platelet function disorders., *Int. J. Lab. Hematol.* 37 Suppl 1 (2015) 18–24. doi:10.1111/ijlh.12346.
- [7] R. Paniccia, R. Priora, A.A. Liotta, R. Abbate, Platelet function tests: a comparative review., *Vasc. Health Risk Manag.* 11 (2015) 133–48. doi:10.2147/VHRM.S44469.
- [8] B. Jilma, Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction., *J. Lab. Clin. Med.* 138 (2001) 152–63.

- [9] E.J. Favalaro, Clinical utility of the PFA-100, *Semin. Thromb. Hemost.* 34 (2008) 709–33. doi:10.1055/s-0029-1145254.
- [10] R. Paniccia, E. Antonucci, N. Maggini, E. Romano, A.M. Gori, R. Marcucci, D. Prisco, R. Abbate, Assessment of platelet function on whole blood by multiple electrode aggregometry in high-risk patients with coronary artery disease receiving antiplatelet therapy, *Am. J. Clin. Pathol.* 131 (2009) 834–842. doi:10.1309/AJCPTE3K1SGAPOIZ.
- [11] L.R. Johnston, P.D. Larsen, A.C. La Flamme, S.A. Harding, Methodological considerations for the assessment of ADP induced platelet aggregation using the Multiplate® analyser., *Platelets.* 24 (2013) 303–7. doi:10.3109/09537104.2012.694086.
- [12] O. Tóth, A. Calatzis, S. Penz, H. Losonczy, W. Siess, W. Siess1, Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood, *Thromb. Haemost.* 96 (2006) 781–788. doi:10.1160/TH06-05-0242.
- [13] M. Mehrabadi, L.D.C. Casa, C.K. Aidun, D.N. Ku, A Predictive Model of High Shear Thrombus Growth, *Ann. Biomed. Eng.* (2016) 1–12. doi:10.1007/s10439-016-1550-5.
- [14] M.K. Puurunen, S.-J. Hwang, C.J. O’Donnell, G. Tofler, A.D. Johnson, Platelet function as a risk factor for venous thromboembolism in the Framingham Heart Study., *Thromb. Res.* 151 (2017) 57–62. doi:10.1016/j.thromres.2017.01.010.
- [15] C. Hayes, S. Kitahara, O. Tcherniantchouk, Decreased Threshold of Aggregation to Low-Dose Epinephrine is Evidence of Platelet Hyperaggregability in Patients with Thrombosis., *Hematol. Rep.* 6 (2014) 5326. doi:10.4081/hr.2014.5326.
- [16] M. Weber, F. Gerdson, K. Gutensohn, V. Schoder, B. Eifrig, D.K. Hossfeld, Enhanced platelet aggregation with TRAP-6 and

collagen in platelet aggregometry in patients with venous thromboembolism, *Thromb. Res.* 107 (2002) 325–328. doi:10.1016/S0049-3848(02)00351-1.

[17] C. Martinez, A.T. Cohen, L. Bamber, S. Rietbrock, Epidemiology of first and recurrent venous thromboembolism: a population-based cohort study in patients without active cancer., *Thromb. Haemost.* 112 (2014) 255–63. doi:10.1160/TH13-09-0793.

[18] C. Kearon, W. Ageno, S.C. Cannegieter, B. Cosmi, G.-J. Geersing, P.A. Kyrle, and P. and D.V. in T.D. Subcommittees on Control of Anticoagulation, Categorization of patients as having provoked or unprovoked venous thromboembolism: guidance from the SSC of ISTH., *J. Thromb. Haemost.* 14 (2016) 1480–3. doi:10.1111/jth.13336.

[19] S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells., *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 1215.

[20] J.C. Souto, L. Almasy, E. Muñiz-Diaz, J.M. Soria, M. Borrell, L. Bayén, J. Mateo, P. Madoz, W. Stone, J. Blangero, J. Fontcuberta, 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.* 20 (2000) 2024–8.

[21] J.G. van der Bom, S.R. Heckbert, T. Lumley, C.E. Holmes, M. Cushman, A.R. Folsom, F.R. Rosendaal, B.M. Psaty, Platelet count and the risk for thrombosis and death in the elderly., *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 399–405.

[22] P.W. Kamphuisen, J.C. Eikenboom, R.M. Bertina, Elevated factor VIII levels and the risk of thrombosis., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 731–738. doi:10.1161/01.ATV.21.5.731.

- [23] J.K. Kruschke, Metric Predicted Variable with Multiple Nominal Predictors, in: *Doing Bayesian Data Anal.*, 2n. Ed., Academic Press, London, 2015: pp. 583–620.
- [24] I. Tirado, J. Mateo, J.M. Soria, A. Oliver, E. Martínez-Sánchez, C. Vallvé, M. Borrell, T. Urrutia, J. Fontcuberta, The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism., *Thromb. Haemost.* 93 (2005) 468–74. doi:10.1160/TH04-04-0251.
- [25] V.M. Morelli, M.C.H. De Visser, H.L. Vos, R.M. Bertina, F.R. Rosendaal, ABO blood group genotypes and the risk of venous thrombosis: effect of factor V Leiden, *J. Thromb. Haemost.* 3 (2005) 183–185. doi:10.1111/j.1538-7836.2004.01071.x.
- [26] P. Prandoni, Venous and arterial thrombosis: Two aspects of the same disease?, *Eur. J. Intern. Med.* 20 (2009) 660–661. doi:10.1016/j.ejim.2009.02.001.
- [27] M. Crescente, A.M. Mezzasoma, M. Del Pinto, F. Palmerini, A. Di Castelnuovo, C. Cerletti, G. De Gaetano, P. Gresele, Incomplete inhibition of platelet function as assessed by the platelet function analyzer (PFA-100) identifies a subset of cardiovascular patients with high residual platelet response while on aspirin, *Platelets.* 22 (2011) 179–87.
- [28] E.F. Mammen, P.C. Comp, R. Gosselin, C. Greenberg, W.K. Hoots, C.M. Kessler, E.C. Larkin, D. Liles, D.J. Nugent, PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction., *Semin. Thromb. Hemost.* 24 (1998) 195–202. doi:10.1055/s-2007-995840.
- [29] M. Böck, J. De Haan, K.H. Beck, K. Gutensohn, H.J. Hertfelder, R. Karger, M.U. Heim, H. Beeser, D. Weber, V. Kretschmer, Standardization of the PFA-100(R) platelet function

test in 105 mmol/l buffered citrate: effect of gender, smoking, and oral contraceptives, *Br. J. Haematol.* 106 (1999) 898–904.

[30] E.J. Favaloro, Utility of the PFA-100 for assessing bleeding disorders and monitoring therapy: a review of analytical variables, benefits and limitations., *Haemophilia.* 7 (2001) 170–9.

[31] I. Martinelli, Von Willebrand factor and factor VIII as risk factors for arterial and venous thrombosis, *Semin. Hematol.* 42 (2005) 49–55. doi:10.1053/j.seminhematol.2004.09.009.

[32] S. Montoro-García, M. Schindewolf, S. Stanford, O.H. Larsen, T. Thiele, The Role of Platelets in Venous Thromboembolism, *Semin. Thromb. Hemost.* 42 (2016) 242–51. doi:10.1055/s-0035-1570079.

Tables and Supplementary Tables

Table 1: Clinical characteristics of patients and controls of the RETROVE Study.

Baseline characteristics	Patients		Controls		p-val ^a
	Males	Females	Males	Females	
Gender (n)	196	204	194	206	
Age (year) (mean \pm SD)	61.5 \pm 16.9	66.2 \pm 20.0	47.6 \pm 17.7	50.5 \pm 18.7	$< 2.2 \cdot 10^{-16}$
BMI (kg \cdot m ⁻²) (mean \pm SD) [†]	28.0 \pm 4.1	28.3 \pm 6.1	26.0 \pm 25.4	24.4 \pm 4.1	$< 2.2 \cdot 10^{-16}$
Smoking (n, %)	37 (18.9)	18 (8.8)	40 (20.6)	35 (17.0)	NS
Alcohol intake (n, %)	119 (60.7)	76 (34.3)	130 (67.0)	98 (47.6)	0.023
Hypertension (n, %)	83 (42.3)	94 (46.1)	35 (18.0)	40 (19.4)	$8.27 \cdot 10^{-15}$
Dyslipidaemia (n, %)	62 (31.6)	75 (36.8)	36 (18.6)	43 (20.9)	$3.46 \cdot 10^{-6}$
Statins (n, %)	46 (23.5)	60 (29.4)	18 (9.3)	32 (15.5)	$5.81 \cdot 10^{-7}$
Diabetes mellitus (n, %)	23 (11.7)	17 (8.3)	10 (5.2)	10 (4.9)	0.0073
Autoimmune disease (n, %)	20 (10.2)	21 (10.3)	14 (7.2)	18 (8.7)	NS
Haemorrhagic ictus (n, %) [†]	0 (0.0)	2 (1.0)	1 (5.0)	0 (0.0)	NS
Arterial thrombosis background (n, %) [†]	14 (7.1)	15 (7.4)	1 (5.0)	1 (5.0)	$1.08 \cdot 10^{-6}$
Non-steroidal anti-inflammatory drugs (n, %)	29 (14.8)	58 (28.4)	23 (11.9)	34 (16.5)	0.0058
Anti-platelet drugs (n, %)	24 (12.2)	18 (8.8)	2 (1.0)	5 (2.4)	$2.46 \cdot 10^{-7}$

Number of individuals for each group. The percentages are given in parentheses.

([†]) Excluded Individuals by technical issues: BMI (2), the ictus haemorrhagic (10), arterial thrombosis background (10) and familial arterial thrombosis background (2).

(^a) The statistical differences, fixed in a *p-value* < 0.05 , are reported only for descriptive purposes. The not-significance is shown as NS.

Table 2: Characteristics of the first thrombotic events in the RETROVE Study.

	Spontaneous			Non-spontaneous		
	Males*	Females*	Total†	Males*	Females*	Total†
Isolated deep vein thrombosis	82 (56.2)	63 (49.6)	145 (53.1)	27 (54.0)	38 (49.4)	65 (51.2)
No isolated deep vein thrombosis	30 (20.6)	19 (15.0)	49 (18.0)	10 (20.0)	11 (14.3)	21 (16.5)
Isolated pulmonary embolism	31 (21.2)	42 (33.1)	73 (26.7)	12 (24.0)	26 (33.8)	38 (29.9)
Visceral thrombosis	2 (1.4)	–	2 (0.7)	1 (2.0)	–	1 (0.8)
Venous sinus thrombosis	1 (0.7%)	3 (2.4)	4 (1.5)	–	2 (2.6)	2 (1.6)
Total#	146 (36.5)	127 (31.8)	273 (68.3)	50 (12.5)	77 (19.3)	127 (31.8)

The percentages are given in parentheses.

(*) The percentages are obtained from the number of thrombosis types divided into the total number of males or females.

(†) The percentages are obtained from the number of thrombosis types divided into the total number of spontaneous or non-spontaneous events.

(#) The percentages were obtained from the number of male, female or total divided into the total number of patients or controls.

Table 3: Descriptive statistics for the PFA and Multiplate™ parameters in the RETROVE Study.

	Patients		Controls		p-values [Ⓐ]
	N*	Mean ± SD [#]	N*	Mean ± SD [#]	
PFA parameters					
PFAadp (s)	397 (3)	77 ± 20.5	397 (3)	86 ± 19.3	3.38 · 10 ⁻¹⁶
PFAepi (s)	397 (3)	110 ± 30	397 (3)	127 ± 33.2	1.15 · 10 ⁻¹⁷
Multiplate™ parameters					
AUC 0.25 µM (AU)	383 (17)	15.9 ± 9.5	383 (17)	15.2 ± 10.2	NS
AUC 0.5 µM (AU)	397 (3)	25.9 ± 14.7	389 (11)	24.8 ± 14.1	NS
AGR 0.25 µM (%)	385 (15)	31.4 ± 17.1	385 (15)	30.3 ± 18.2	NS
AGR 0.5 µM (%)	397 (3)	47.3 ± 25	390 (10)	45.2 ± 24.4	NS
SLP 0.25 µM (AU · min ⁻¹)	384 (16)	5.1 ± 1.8	385 (15)	4.93 ± 1.9	NS
SLP 0.5 µM (AU · min ⁻¹)	397 (3)	6.9 ± 3.0	390 (10)	6.7 ± 2.9	NS
Other parameters					
FcVIIIc (%)	397 (3)	231.0 ± 84.1	397 (3)	143.0 ± 53.1	2.32 · 10 ⁻⁵⁹
vWF (%)	400	201.0 ± 92.8	400	117.0 ± 53.2	3.54 · 10 ⁻⁵²

The PFA parameters are given in (s) second. The Multiplate™ parameters are given in (AU) absorbance units, (%) percentage of aggregation and (AU · min⁻¹) absorbance units per minute.

(*) Number of the individuals analysed. The excluded individuals by technical issues are shown in parentheses.

(#) Means of PFA parameters and standard deviations (SD).

([Ⓐ]) The statistical significances for the Mann-Whitney test are fixed in a *p-value* < 0.05.

Table 4: *Odds ratio* (OR) of venous thromboembolism (VTE) events for the PFA parameters, under the 10th percentiles of controls, and MultiplateTM parameters, over the 90th percentiles of controls, in the RETROVE Study.

	Risk Interval	P*	C*	Model 1 ^a		Model 2 ^b		Model 3 ^c		Model 4 ^d	
		N (%)	N (%)	OR (95% CI)	p-val ^g	OR (95% CI)	p-val ^g	OR (95% CI)	p-val ^g	OR (95% CI)	p-val ^g
PFA											
PFAadp	[44–66]	128 (32.2)	42 (10.6)	4.02 (2.76–5.95)	$1.04 \cdot 10^{-12}$	3.36 (2.48–5.50)	$1.40 \cdot 10^{-10}$	2.24 (1.44–3.49)	$3.40 \cdot 10^{-4}$	2.90 (1.91–4.46)	$8.84 \cdot 10^{-7}$
PFAepi	[58–93]	110 (27.7)	41 (10.3)	3.33 (2.27–4.97)	$1.65 \cdot 10^{-9}$	2.87 (1.93–4.34)	$3.50 \cdot 10^{-7}$	1.63 (1.04–2.59)	0.035	1.97 (1.28–3.07)	0.002
RPFA		67 (16.9)	15 (3.8)	5.17 (2.98–9.56)	$2.64 \cdot 10^{-8}$	4.41 (2.49–7.58)	$1.06 \cdot 10^{-6}$	2.60 (1.38–5.13)	0.004	2.82 (1.52–5.48)	$6.63 \cdot 10^{-4}$
MultiplateTM											
AUC 0.25 μ M	[27.8–66]	37 (9.7)	39 (10.2)	0.94 (0.59–1.52)	NS	0.92 (0.55–1.51)	NS	0.93 (0.53–1.59)	NS	0.96 (0.57–1.59)	NS
AUC 0.5 μ M	[47–79]	42 (10.6)	40 (10.3)	1.03 (0.65–0.89)	NS	0.97 (0.59–1.59)	NS	1.03 (0.6–1.74)	NS	0.93 (0.56–1.54)	NS
AGR 0.25 μ M	[52.1–119]	39 (10.1)	39 (10.1)	1 (0.63–1.6)	NS	0.98 (0.59–1.61)	NS	1 (0.58–1.71)	NS	0.99 (0.59–1.64)	NS
AGR 0.5 μ M	[81.8–150]	48 (12.1)	40 (10.3)	1.2 (0.77–1.88)	NS	1.12 (0.7–1.81)	NS	1.04 (0.61–1.75)	NS	1.09 (0.67–1.78)	NS
SLP 0.25 μ M	[7.16–16.3]	43 (11.2)	39 (10.1)	1.12 (0.71–1.77)	NS	1 (0.61–1.63)	NS	0.94 (0.55–1.61)	NS	1.08 (0.66–1.78)	NS
SLP 0.5 μ M	[11.1–21.8]	41 (10.3)	39 (10)	1.04 (0.65–1.65)	NS	0.98 (0.6–1.6)	NS	1.05 (0.61–1.79)	NS	0.93 (0.56–1.54)	NS

The *odds ratio* (OR) within the 95% confidence intervals (CI) in parentheses for the: **(a)** non-adjusted model (Model 1); **(b)** adjusted for age and gender (Model 2); **(c)** adjusted for age, gender and vWF (Model 3) and **(d)** adjusted for age, gender, factor VIII (FVIII), vWF and ABO blood group system, in the PFA parameters (Model 4), and age, gender and body mass index (BMI), in the MultiplateTM parameters (Model 4).

(*) Number of individuals for patients (P) and controls (C) with the percentages in each percentile. The number of excluded individuals is shown in parentheses in Table 2.

(^g) The statistical significances are fixed in a *p-value* < 0.05. The non-significance is shown as NS.

Supplementary Table 1: Clinical baseline characteristics of the variables in the logistic regression models.

	Patients		Controls	
	Males	Females	Males	Females
Gender	196	204	194	206
Age (n, %)				
Adulthood–group 1 (18–64)	117 (59.7)	82 (40.2)	158 (81.4)	156 (75.7)
Elders–group 2 (65–94)	79 (40.3)	122 (59.8)	36 (18.6)	50 (24.3)
BMI (kg · m ⁻²) (n, %) [†]				
Normal (< 25.0)	52 (26.5)	63 (31.2)	89 (45.9)	117 (56.8)
Overweigh (25.0–30.0)	91 (46.4)	73 (36.1)	75 (38.7)	68 (33.0)
Obesity (> 30)	53 (27.0)	66 (32.7)	30 (15.5)	21 (10.2)
Factor VIII (n, %)	87 (44.4)	112 (55.4)	9 (4.6)	31 (15.2)
von Willebrand factor (n, %)	107 (54.6)	118 (58.1)	19 (9.8)	22 (10.7)
ABO system (n, %) [†]				
O group	45 (23.2)	47 (23.4)	74 (38.7)	78 (38.4)
Non-O group	149 (76.8)	154 (76.6)	117 (61.3)	125 (61.6)

([†]) For BMI (2) and ABO (11) blood group system a few individuals are excluded by technical issues.

Supplementary Table 2: *Odds ratio* (OR) of venous thromboembolism (VTE) events, taking into account the 10th, 20th, 30th and 50th percentile of controls, for each PFA parameters in the RETROVE Study.

Interval	Patients*	Controls*	Model 1 ^a	
	N (%)	N (%)	OR (95% CI)	p-val ^o
PFAadp (s)				
(44-66]	128 (32.2)	42 (10.6)	4.82 (3.02–7.36)	$1.10 \cdot 10^{-13}$
(66-72]	66 (16.6)	46 (9.8)	2.27 (1.47–3.53)	$2.52 \cdot 10^{-4}$
(72-75]	26 (6.5)	34 (11.6)	1.21 (0.69–2.11)	NS
(75-82]	53 (13.5)	79 (8.6)	1.06 (0.70–1.60)	NS
(82-233]	124 (31.2)	196 (49.4)	1.00 (reference)	–
PFAepi (s)				
(39-93]	110 (27.7)	41 (10.3)	5.00 (3.28–7.76)	$2.28 \cdot 10^{-13}$
(93-101.2]	67 (19.9)	39 (9.8)	3.20 (2.03–5.12)	$7.39 \cdot 10^{-7}$
(101.2-108]	43 (10.8)	41 (10.3)	1.96 (1.20–3.20)	0.007
(108-120]	73 (18.4)	82 (20.7)	1.66 (1.12–2.47)	0.012
(120-300]	104 (26.2)	194 (48.9)	1.00 (reference)	–

Odds ratio (OR) within the 95% confidence intervals (CI) in parentheses for the (a) non-adjusted model (Model 1).

(*) Number of individuals with the percentages in each percentile. The number of excluded individuals by technical issues is shown in parentheses in Supplementary Table 1.

(^o) The statistical significances are fixed in a *p-value* < 0.05. The not-significance is shown as NS.

Figures

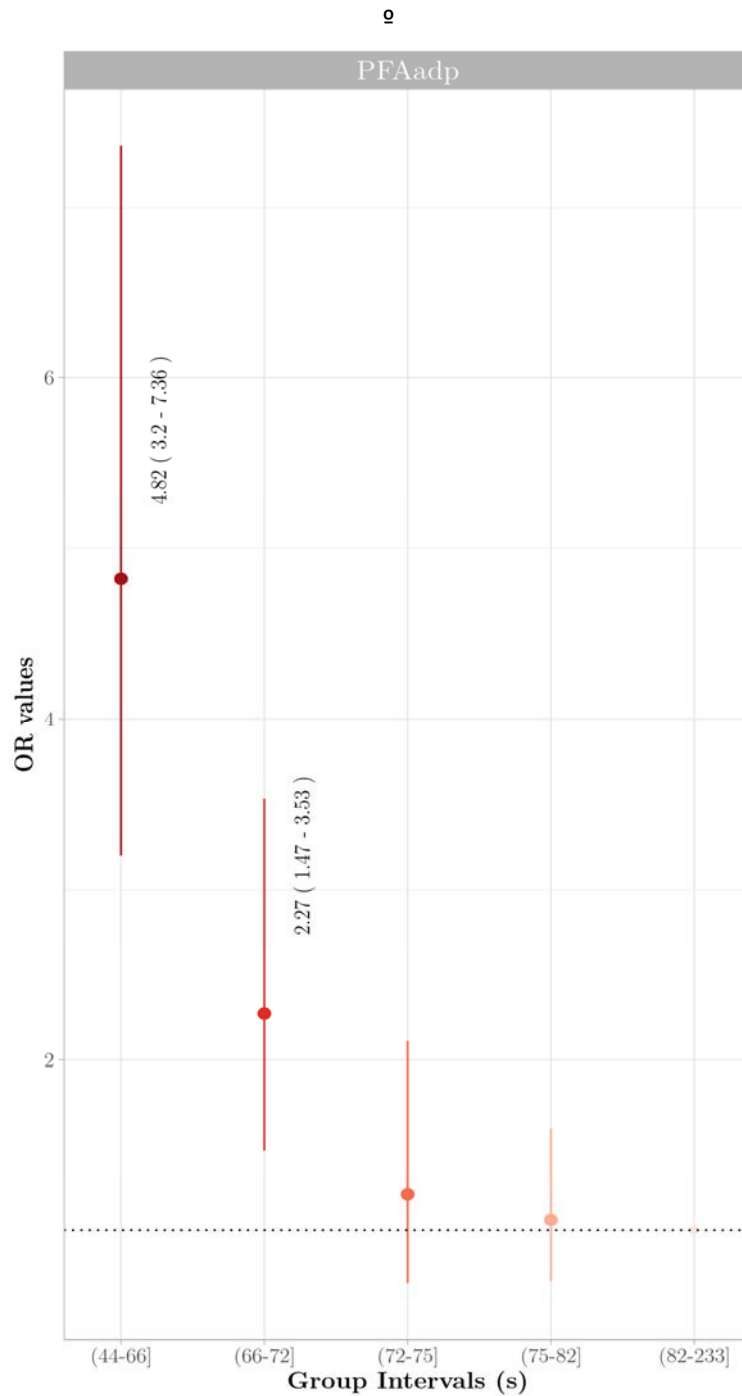


Figure 1a: Risk of venous thromboembolism (VTE) following Model 1 for the PFAadp. The *odds ratio* (OR) and the 95% confidence intervals (CI) with significant *p-values* are shown in the plot. The rest of the OR and the 95% CI are shown in the Supplementary Table 3. The statistical significance of lower CI is fixed in 1.0, as indicated by the vertical broken line. La imagen corresponde a la **Figura 3.6** del presente trabajo.

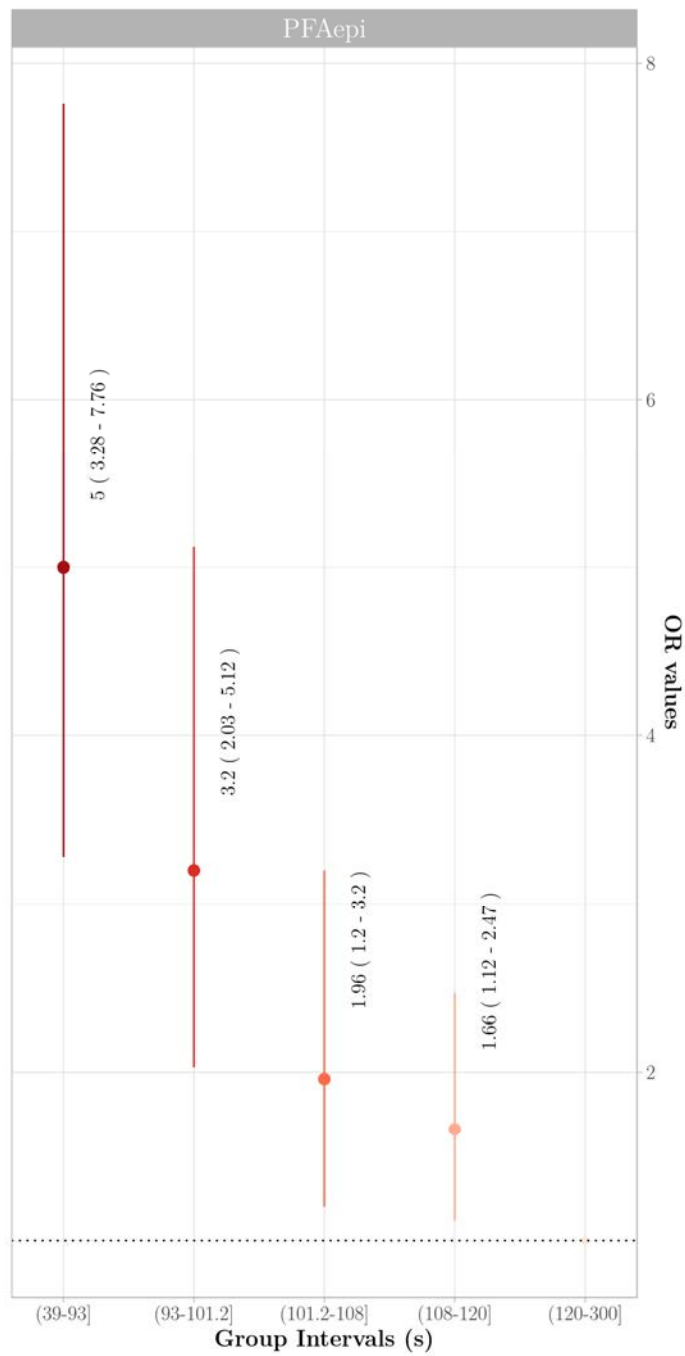


Figure 1b: Risk of venous thromboembolism (VTE) following Model 1 for the PFAepi. The *odds ratio* (OR) and the 95% confidence intervals (CI) with significant *p-values* are shown in the plot. The rest of the OR and the 95% CI are shown in the Supplementary Table 3. The statistical significance of lower CI is fixed in 1.0, as indicated by the vertical broken line. La imagen corresponde a la **Figura 3.7** del presente trabajo.

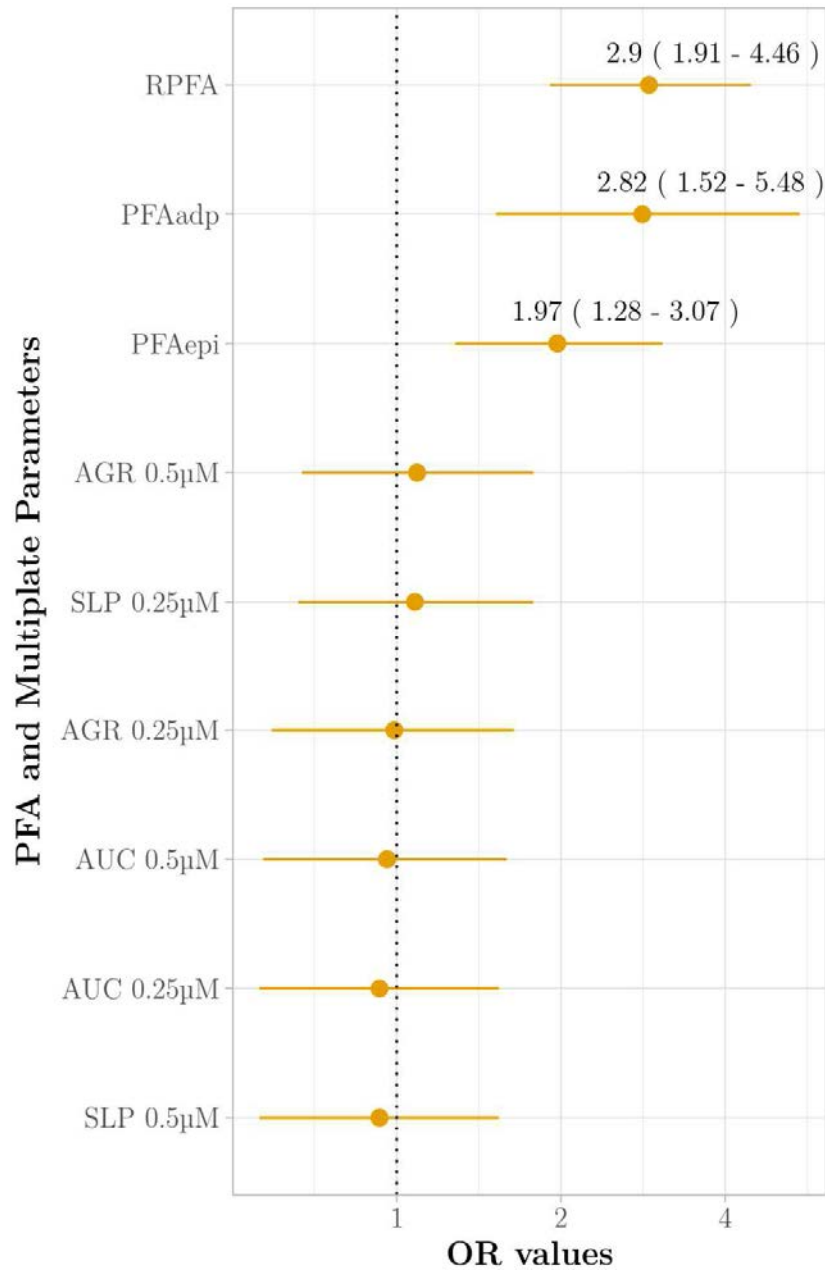


Figure 2: Risk of venous thromboembolism (VTE) following the Models 4 for the PFA and Multiplate™ parameters. The *odd ratio* (OR) and the 95% confidence intervals (CI) with significant *p-values* are shown in the plot. The rest of the OR and the 95% CI are shown in the Table 3. The statistical significance of lower CI is fixed in 1.0, as indicated by the vertical broken line. La imagen corresponde a la **Figura 3.8** del presente trabajo.

Capítulo 4

Discusión

El proyecto GAIT 2, con sus 935 individuos distribuidos en 35 familias, ha permitido la caracterización biológica y genética de la plaqueta en dos ámbitos principales: la influencia de la edad y el sexo en los parámetros plaquetarios (Estudio #1) y su determinación genética (Estudio #2).

En el Estudio #1 la presencia de una numerosa población infantil sana (125 individuos menores de 12 años) ha permitido observar que la función plaquetaria (PFA_{adp} y PFA_{epi}) se mantiene constante, mientras que la clara relación inversa y no lineal entre PLT y el MPV (nomograma de Bessman) mantiene la masa plaquetaria inalterada a lo largo de la vida [113]. Precisamente la inclusión de la población infantil en el estudio determina la relación entre PLT y MPV. Además, los LMM han obtenido una modelización, según edad y sexo, de los parámetros plaquetarios similar a la de otros análisis [37,38]. Los recuentos plaquetarios analizados disminuyen con la edad y son mayores en mujeres que en hombres (Figura 3.1). El MPV, así como otros parámetros relacionados (PDW, P-LCR o parámetros de IPF) (Figura 3.2 y 3.3), no muestra ninguna influencia del sexo, pero si que aumentan con la edad [113].

En el ámbito de la determinación genética, algunos de los parámetros plaquetarios como el PLT, MPV, PDW o el PCT han sido ampliamente caracterizados en la población general. Sin embargo otros parámetros como los de inmadurez (IPF) o función (PFA) están todavía escasamente caracterizado.

El Estudio #2, con las extensas familias del proyecto GAIT 2, ha permitido obtener una visión completa de la determinación genética para 11 parámetros plaquetarios [102]. Los resultados han estimado una elevada h^2 de la VTE (67%), similar a la obtenida con anterioridad en el estudio GAIT 1 [59]. Además, se han confirmado unas elevadas h^2 en los principales parámetros analizados en artículos previos [85].

Para los parámetros de IPF se han obtenido unas h^2 de entre 59–69%, y del 45% y del 52% para PFAadp y PFAepi, respectivamente (Figura 3.4) [102].

El análisis de correlaciones en el proyecto GAIT 2 determinó la ausencia de correlación genética entre el riesgo o *liability* de VTE y los parámetros plaquetarios [102]. De manera complementaria y paralela al análisis en familias, el estudio RETROVE, indica la influencia de algunos parámetros plaquetarios en el de riesgo de VTE (Estudio #3 y #4). Para ello, los modelos GLM utilizados incluyen las posibles variables confusoras (Tabla 4.1).

En este sentido, el Modelo 2 (véase Tabla 4.1) del Estudio #3 ha asociado el PLT superior a $302 \cdot 10^9/L$, el PLTOP superior a $317 \cdot 10^9/L$ y el PCT superior a 0.33% con un riesgo aumentado de VTE en mujeres, pero no en hombres (Figura 3.5). Los recuentos elevados puede implicar una mayor potencialidad en los procesos de adhesión y agregación plaquetarias [121]. Sin embargo, los valores elevados de MPV, PDW y P-LCR no se han asociado a riesgo de VTE.

Paralelamente el Estudio #4 ha revelado que los parámetros de PFA juegan un importante papel en la evaluación de la funcionalidad plaquetaria y el riesgo de VTE. Una revisión previa han puesto de manifiesto la asociación de CT cortos y la enfermedad cardiovascular [46]. Por primera vez, el proyecto RETROVE ha puesto de manifiesto sistemáticamente la relación existente entre los valores de CT y el riesgo de VTE.

En primer lugar, se observa que el riesgo de VTE aumenta con los valores acortados de CT. En este sentido, valores de CT inferiores a 72 segundos (PFAadp) y 120 segundos se han asociado a un riesgo continuo de VTE (Figura 3.6 y 3.7). En segundo lugar, el Modelo 4 (véase Tabla 4.1) indica que el riesgo de VTE es especialmente elevado en los CT inferiores a 66 segundos, para el PFAadp, y a 93 segundos,

Tabla 4.1: Modelos de regresión lineal generalizados (GLM) utilizados para el cálculo de riesgo de enfermedad tromboembólica venosa (VTE) en el proyecto RETROVE¹.

Estudio	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4
Estudio #3 (PLT, PLTOP, PCT, RPNP MPV, PDW y P-LCR)	Edad ^a Sexo	Edad Sexo BMI ^b Hipertensión FVIII ^c vWF ^d ABO ^e	–	–
Estudio #4 (PFAadp y PFAepi)	Crudo	Edad Sexo	Edad Sexo	Edad Sexo BMI FVIII vWF ABO
Estudio #4 (ABC, AGR y SLP) ^f	Crudo	Edad Sexo	Edad Sexo vWF	Edad Sexo BMI

¹ La totalidad de las variables son discretas y/o dicotómicas.

^a Para los individuos con edades < 64 años se categorizaron como grupo 1 (adultos), mientras que los individuos con edades > 64 años como grupo 2 (ancianos).

^b La variable *body mass index* (BMI) se categoriza en tres grupos: normal (< 25), con sobrepeso (entre 25 y 30) y obeso (> 30). Las unidades de corte son dadas en kilogramo por metro cuadrado.

^c La variable factor VIII (FVIII) se categoriza como grupo de riesgo para valores > 216%, mientras que valores < 216% se considera grupo normal.

^d La variable factor von Willebrand (vWF) se categoriza como grupo de riesgo para valores > 183%, mientras que valores < 183% se considera grupo normal.

^e El sistema ABO se categoriza como grupo O y grupo no O.

^f Parámetros del MultiplateTM obtenidos en respuesta a baja (0,25 μM) y alta (0,5 μM) concentraciones de ADP como agonista.

para el PFAepi (Figura 3.8). Sin embargo, los parámetros obtenidos mediante el agregómetro Multiplate™ no se han asociado con el riesgo de VTE.

Capítulo 5

Conclusiones

1. Conclusiones del Estudio #1

- ⇒ Las parejas de parámetros plaquetarios analizadas por diferentes analizadores hematológicos son estadísticamente diferentes. Los valores obtenidos por impedancia con el umbral de volumen superior a 40 fL son mayores que los obtenidos por el analizador hematológico estándar –tanto por impedancia como por el canal óptico–, indicando que es un método más preciso para la medición de la población de plaquetas con mayor volumen.
- ⇒ Los recuentos plaquetarios son mayores en mujeres que en hombres, excepto en el grupo infantil en que son mayores en las niñas. Los recuentos disminuyen con la edad en ambos sexos.
- ⇒ Los plaquetocritos siguen la misma tendencia que los recuentos, es decir, son mayores en mujeres que en hombres y, en el grupo infantil, son mayores en las niñas. Asimismo disminuyen con la edad.
- ⇒ Los parámetros de volumen –volumen plaquetario medio, amplitud de distribución de los volúmenes plaquetarios y porcentaje de plaquetas de más de 12 fL– aumentan con la edad y son independientes del sexo.
- ⇒ Entre la población infantil y adolescente se describe la máxima variación entre grupos de edad, tanto en recuentos como en volumen.
- ⇒ La relación inversa y no lineal entre el recuento de plaquetas y el volumen plaquetario medio, descrita mediante el nomograma de Bessman, se replica en nuestro estudio.

- ⇒ Al igual que en los parámetros de volumen, los parámetros de la fracción plaquetaria inmadura aumentan con la edad y no son modificados por el efecto del sexo
- ⇒ Los parámetros de función plaquetaria no varían en relación al sexo ni a la edad. Únicamente se observa ligeramente significativa entre la población infantil y la adulta.

2. Conclusiones del Estudio #2

- ⇒ Los parámetros de recuento de plaquetas, volumen plaquetario medio, y amplitud de distribución de los volúmenes plaquetarios se encuentran en gran parte, determinados genéticamente con unas heredabilidades que oscilan entre 40–65%. Éstas confirman los resultados de estudios previos.
- ⇒ La heredabilidad del fenotipo porcentaje de plaquetas de volumen superior a 12 fL ha sido estimada por primera vez con un resultado alto, del 64%.
- ⇒ Las heredabilidades de los fenotipos de la fracción plaquetaria inmadura has sido determinadas por primera vez asimismo con valores altos, entre 59–69%.
- ⇒ Las heredabilidades de los fenotipos de función plaquetaria global han sido asimismo estimados por primera vez con resultados entre 42–52%.
- ⇒ Las heredabilidades de la trombosis total (46%) y de la trombosis venosa (67%) han dado valores elevados, mientras que la heredabilidad de la trombosis arterial (23%) ha sido no significativa.
- ⇒ No se ha encontrado correlación genética entre los fenotipos plaquetarios y el riesgo de VTE.

3. Conclusiones del Estudio #3

- ⇒ En el proyecto RETROVE, los recuentos plaquetarios elevados, aún sin sobrepasar el límite superior de la normalidad, se asocian a un incremento del riesgo de VTE, únicamente en mujeres. En el recuento estándar el riesgo aparece por encima de $312 \times 10^9/L$ plaquetas y en el recuento óptico por encima de $317 \times 10^9/L$.
- ⇒ En el proyecto RETROVE, el plaquetocrito elevado (0.33%), aún sin sobrepasar el límite superior de la normalidad, se asocia a un incremento del riesgo de VTE, únicamente en mujeres.
- ⇒ En el estudio RETROVE, los niveles elevados de los parámetros de volumen plaquetario no se han asociado a un incremento de riesgo de VTE.

4. Conclusiones del Estudio #4

- ⇒ En el estudio RETROVE, el acortamiento de los tiempos de oclusión obtenidos en el analizador PFA-100[®], tanto con colágeno-ADP como con colágeno-epinefrina, se asocia asociado a un incremento del riesgo de VTE de forma inversamente proporcional.
- ⇒ Los tiempos de oclusión situados por debajo del percentil 10, en concreto inferiores a 66 segundos para el colágeno-ADP e inferior a 93 segundos para el colágeno-epinefrina, son especialmente relevantes en cuanto al riesgo de VTE. Estos valores se encuentran dentro de los intervalos de normalidad de nuestro Hospital.
- ⇒ La capacidad del analizador PFA-100[®] para detectar riesgo de VTE indica que puede ser un método altamente útil en la práctica clínica en el campo de las trombosis.
- ⇒ En el estudio RETROVE, la función plaquetaria aumentada, analizada con el agregómetro Multiplate[™], tanto a bajas como altas concentraciones de ADP no se asocia a incremento del riesgo de VTE.

Bibliografía

Referencias

- [1] A.H.T. Robb-Smith, Why the Platelets were Discovered, *Br. J. Haematol.* 13 (1967) 618–637.
- [2] D.B. Brewer, Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet., *Br. J. Haematol.* 133 (2006) 251–8. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06036.x.
- [3] C.A. Owen, Platelets, in: W.L. Nichols, J.E. Walter Bowie (Eds.), *A Hist. Blood Coagul.*, 1a. Ed., Mayo Foundation for Medical Education and Research, Rochester, 2001: pp. 75–86.
- [4] P. Mazzeo, A.L. Calligari, A. Calligari, Giulio Bizzozero: a pioneer of cell biology., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 776–81. doi:10.1038/35096085.
- [5] J.H. Wright, The Origin and Nature of the Blood Plates, *Bost. Med. Surg. J.* 154 (1906) 643–645. doi:10.1056/NEJM190606071542301.
- [6] C.A. Owen, Thromboembolism, in: W.L. Nichols, J.E. Walter Bowie (Eds.), *A Hist. Blood Coagul.*, 1a. Ed., Mayo Foundation for Medical Education and Research, Rochester, 2001: pp. 165–188.
- [7] C.A. Owen, Current Methods of Therapy: Heparin, in: W. Nichols, J. Walter Bowie (Eds.), *A Hist. Blood Coagul.*, 1a. Ed., Mayo Foundation for Medical Education and Research, Rochester, 2001: pp. 245–256.
- [8] C.A. Owen, Current Methods of Therapy: Vitamins and Anti-Vitamins, in: W. Nichols, J. Walter Bowie (Eds.), *A Hist. Blood Coagul.*, 1a. Ed., Mayo Foundation for Medical Education and Research, Rochester, 2001: pp. 261–268.
- [9] J.N. Thon, J.E. Italiano, Platelets: production, morphology and ultrastructure, in: P. Gresele, G.V.R. Born, C. Patrono, C.P. Page (Eds.), *Antiplatelets Agents*, 1a. Ed., Springer Berlin Heidelberg, London, 2012: pp. 3–22. doi:10.1007/978-3-642-29423-5-1.
- [10] N. Pujol-Moix, I. Español, Producción, distribución y destrucción de las plaquetas, in: N. Pujol-Moix (Ed.), *Trombocitopenias*, 2a. Ed., Ediciones Harcourt, Barcelona, 2002: pp. 61–82.

- [11] N. Pujol-Moix, Anatomía ultramicroscópica de las plaquetas. Interrelaciones estructura-función, in: N. Pujol-Moix (Ed.), Trombocitopenias, 2a. Ed., Ediciones Harcourt, Barcelona, 2002: pp. 3–10.
- [12] H. Kawakami, H. Hirano, Rearrangement of the open-canalicular system of the human blood platelet after incorporation of surface-bound ligands. A high-voltage electron-microscopic study., *Cell Tissue Res.* 245 (1986) 465–9.
- [13] J. White, J. Gerrard, Ultrastructural features of abnormal blood platelets. A review., *Am. J. Pathol.* (1976).
- [14] J.G. White, Platelet Structure, in: A.D. Michelson (Ed.), Platelets, 2a. Ed., Academic Press, 2007: pp. 45–74.
- [15] J.G. White, Electron Microscopy Methods for Studying Platelet Structure and Function, in: J.M. Gibbins, M.P. Mahaut-Smith (Eds.), Platelets Megakaryocytes Vol. 1 Funct. Assays, Humana Press, Totowa, NJ, 2004: pp. 47–63. doi:10.1385/1-59259-782-3:047.
- [16] P. Gentry, The mammalian blood platelet: its role in haemostasis, inflammation and tissue repair, *J. Comp. Pathol.* 107 (1992) 243–270.
- [17] J.G. White, Platelet glycosomes, *Platelets.* 10 (1999) 242–6. doi:10.1080/09537109976095.
- [18] S.K. Austin, Haemostasis, *Medicine (Baltimore).* 41 (2013) 208–211. doi:10.1016/j.mpmed.2013.01.018.
- [19] B. Furie, B.C. Furie, The molecular basis of blood coagulation, *Cell.* 53 (1988) 505–518. doi:10.1016/0092-8674(88)90567-3.
- [20] K.J. Clemetson, Platelets and primary haemostasis, *Thromb. Res.* 129 (2012) 220–224.
- [21] L. Jobling, L. Eyre, Haemostasis, blood platelets and coagulation, *Anaesth. Intensive Care Med.* 14 (2013) 51–53. doi:10.1016/j.mpaic.2012.12.001.
- [22] C. Schulz, S. Massberg, Platelets in Atherosclerosis and Thrombosis, in: Antiplatelets Agents, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2012: pp. 111–133. doi:10.1007/978-3-642-29423-5_5.
- [23] J.W. Semple, J.E. Italiano, J. Freedman, Platelets and the immune continuum., *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 264–74. doi:10.1038/nri2956.

- [24] X.R. Xu, D. Zhang, B.E. Oswald, N. Carrim, X. Wang, Y. Hou, Q. Zhang, C. Lavalle, T. McKeown, A.H. Marshall, H. Ni, Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond., *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* (2016) 1–22.
- [25] P.G. de Groot, R.T. Urbanus, M. Roest, Platelet Interaction with the Vessel Wall, in: *Antiplatelets Agents, Handb. Exp. Pharmacol.*, 2012: pp. 87–110.
- [26] G. Escolar, J.G. White, Changes in Glycoprotein Expression after Platelet Activation: Differences between In Vitro and In Vivo Studies, *Thromb. Haemost.* 83 (2000) 371–386.
- [27] S.P. Jackson, S.M. Schoenwaelder, Antiplatelet therapy: in search of the “magic bullet,” *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003) 775–789. doi:10.1038/nrd1198.
- [28] N. Pujol-Moix, M. Díaz-Ricart, M. Serradell, G. Escolar, A. Ordinas, C. Castellarnau, B. Fusté, F. Martínez-Brotons, Composición química y funciones de las plaquetas, in: N. Pujol-Moix (Ed.), *Trombocitopenias*, 2a. Ed., Ediciones Harcourt, Barcelona, 2002: pp. 11–47.
- [29] M. Díaz-Ricart, M. Serradell, G. Escolar, A. Ordinas, C. Castellarnau, N. Pujol-Moix, B. Fusté, F. Martínez-Brotons, Composición química y funciones de las plaquetas, in: N. Pujol-Moix (Ed.), *Trombocitopenias*, 2a. Ed., Ediciones Harcourt, Barcelona, 2002: pp. 11–47.
- [30] M. Hoffman, D.M. Monroe, Coagulation 2006: A Modern View of Hemostasis, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 21 (2007) 1–11. doi:10.1016/j.hoc.2006.11.004.
- [31] T. Madhusudhan, B.A. Kerlin, B. Isermann, The emerging role of coagulation proteases in kidney disease, *Nat. Rev. Nephrol.* 12 (2015) 94–109. doi:10.1038/nrneph.2015.177.
- [32] J.W.M. Heemskerk, N.J.A. Mattheij, J.M.E.M. Cosemans, Platelet-based coagulation: different populations, different functions., *J. Thromb. Haemost.* 11 (2013) 2–16. doi:10.1111/jth.12045.
- [33] J.N. Thon, J.E. Italiano, Platelet formation., *Semin. Hematol.* 47 (2010) 220–6. doi:10.1053/j.seminhematol.2010.03.005.

- [34] G. Biino, I. Santimone, C. Minelli, R. Sorice, B. Frongia, M. Traglia, S. Ulivi, A. Di Castelnuovo, M. G?gele, T. Nutile, M. Francavilla, C. Sala, N. Pirastu, C. Cerletti, L. Iacoviello, P. Gasparini, D. Toniolo, M. Ciullo, P. Pramstaller, M. Pirastu, G. de Gaetano, C.L. Balduini, Age- And Sex-Related Variations in Platelet Count in Italy: A Proposal of Reference Ranges Based on 40987 Subjects' Data, *PLoS One*. 8 (2013) e54289. doi:10.1371/journal.pone.0054289.
- [35] M.R. Taylor, C. V Holland, R. Spencer, J.F. Jackson, G.I. O'Connor, J.R. O'Donnell, Haematological reference ranges for schoolchildren., *Clin. Lab. Haematol.* 19 (1997) 1–15.
- [36] M.F. Buckley, J.W. James, D.E. Brown, G.S. Whyte, M.G. Dean, C.N. Chesterman, J.A. Donald, A novel approach to the assessment of variations in the human platelet count., *Thromb. Haemost.* 83 (2000) 480–4.
- [37] C.L. Balduini, P. Noris, Platelet count and aging., *Haematologica*. 99 (2014) 953–5.
- [38] G. Lippi, T. Meschi, L. Borghi, Mean platelet volume increases with aging in a large population study, *Thromb. Res.* 129 (2012) e159-160. doi:10.1016/j.thromres.2011.12.031.
- [39] N. Pujol-Moix, M.P. Pascual, Clínica y diagnóstico general de las trombocitopenias, in: N. Pujol-Moix (Ed.), *Trombocitopenias*, 2a. Ed., Ediciones Harcourt, Barcelona, 2002: pp. 91–107.
- [40] J. Levin, J.D. Bessman, The inverse relation between platelet volume and platelet number. Abnormalities in hematologic disease and evidence that platelet size does not correlate with platelet age, *J. Lab. Clin. Med.* 101 (1983) 295–307.
- [41] J. Levin, J.D. Bessman, The inverse relation between platelet volume and platelet number. Abnormalities in hematologic disease and evidence that platelet size does not correlate with platelet age., *J. Lab. Clin. Med.* 101 (1983) 295–307.
- [42] J. David Bessman, L.J. Williams, P. Ridgway Gilmer, Mean Platelet Volume. The Inverse Relation of Platelet Size and Count in Normal Subjects, and an Artifact of Other Particles, *Am. J. Clin. Pathol.* 76 (1981).
- [43] E.F. Mammen, P.C. Comp, R. Gosselin, C. Greenberg, W.K. Hoots,

- C.M. Kessler, E.C. Larkin, D. Liles, D.J. Nugent, PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction., *Semin. Thromb. Hemost.* 24 (1998) 195–202. doi:10.1055/s-2007-995840.
- [44] G. Escolar, M. Picó Pascual, C. Castellarnau, M. Lozano, S. Pérez, M. Díaz-Ricart, A. Ordinas, Estudios bioquímicos y funcionales de las plaquetas, in: N. Pujol-Moix (Ed.), *Trombocitopenias*, 2a. Ed., Ediciones Harcourt, Barcelona, 2002: pp. 109–134.
- [45] B. Jilma, Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction., *J. Lab. Clin. Med.* 138 (2001) 152–63.
- [46] E.J. Favalaro, Clinical utility of the PFA-100, *Semin. Thromb. Hemost.* 34 (2008) 709–33. doi:10.1055/s-0029-1145254.
- [47] M. Böck, J. De Haan, K.H. Beck, K. Gutensohn, H.J. Hertfelder, R. Karger, M.U. Heim, H. Beeser, D. Weber, V. Kretschmer, Standardization of the PFA-100(R) platelet function test in 105 mmol/l buffered citrate: effect of gender, smoking, and oral contraceptives, *Br. J. Haematol.* 106 (1999) 898–904.
- [48] Y.U. Cho, H.S. Chi, S. Jang, C.J. Park, Reconfirmation of preanalytical variables and establishment of reference intervals of platelet function analyzer-100 closure times in Korean adults, *Korean J. Lab. Med.* 27 (2007) 318–323. doi:10.3343/kjlm.2007.27.5.318.
- [49] C. Briggs, P. Harrison, S.J. Machin, Continuing developments with the automated platelet count., *Int. J. Lab. Hematol.* 29 (2007) 77–91.
- [50] P. Harrison, C. Briggs, S.J. Machin, Platelet Counting, in: J.M. Gibbins, M.P. Mahaut-Smith (Eds.), *Platelets Megakaryocytes Vol. 1 Funct. Assays*, 1a. Ed., Humana Press, Totowa, 2004: pp. 29–46. doi:10.1385/1592597823.
- [51] C. Briggs, S. Kunka, D. Hart, S. Oguni, S.J. Machin, Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia., *Br. J. Haematol.* 126 (2004) 93–9.
- [52] C. Briggs, Quality counts: new parameters in blood cell counting, *Int. J. Lab. Hematol.* 31 (2009) 277–97. doi:10.1111/j.1751-553X.2009.01160.x.
- [53] I. Pons, M. Monteagudo, G. Lucchetti, L. Muñoz, G. Perea, I. Colomina, J. Guiu, J. Obiols, Correlation between immature platelet

- fraction and reticulated platelets. Usefulness in the etiology diagnosis of thrombocytopenia, *Eur. J. Haematol.* 85 (2010) 158–63. doi:10.1111/j.1600-0609.2010.01468.x.
- [54] N. Vilalta, J.C. Souto, Investigación de la trombofilia venosa. Presente y futuro, *Angiologia.* 66 (2014) 190–198. doi:10.1016/j.angio.2014.03.001.
- [55] F.R. Rosendaal, Venous Thrombosis: The Role of Genes, Environment, and Behavior, *Hematology.* 2005 (2005) 1–12. doi:10.1182/asheducation-2005.1.1.
- [56] G. Lippi, M. Franchini, G. Targher, Arterial thrombus formation in cardiovascular disease., *Nat. Rev. Cardiol.* 8 (2011) 502–512. doi:10.1038/nrcardio.2011.91.
- [57] C. Weber, A. Zerneck, P. Libby, The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 802–815. doi:10.1038/nri2415.
- [58] R.P. Choudhury, V. Fuster, Z. a Fayad, Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis., *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 913–925. doi:10.1038/nrd1548.
- [59] J.C. Souto, L. Almasy, M. Borrell, F. Blanco-Vaca, J. Mateo, J.M. Soria, I. Coll, R. Felices, W. Stone, J. Fontcuberta, J. Blangero, Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia., *Am. J. Hum. Genet.* 67 (2000) 1452–9. doi:10.1086/316903.
- [60] A.S. Wolberg, F.R. Rosendaal, J.I. Weitz, I.H. Jaffer, G. Agnelli, T. Baglin, N. Mackman, Venous thrombosis, *Nat. Rev. Dis. Prim.* (2015) 15006. doi:10.1038/nrdp.2015.6.
- [61] M.-L. von Brühl, K. Stark, A. Steinhart, S. Chandraratne, I. Konrad, M. Lorenz, A. Khandoga, A. Tirniceriu, R. Coletti, M. Köllnberger, R.A. Byrne, I. Laitinen, A. Walch, A. Brill, S. Pfeiler, D. Manukyan, S. Braun, P. Lange, J. Riegger, J. Ware, A. Eckart, S. Haidari, M. Rudelius, C. Schulz, K. Ehtler, V. Brinkmann, M. Schwaiger, K.T. Preissner, D.D. Wagner, N. Mackman, B. Engelmann, S. Massberg, Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo., *J. Exp. Med.* 209 (2012)

- 819–35. doi:10.1084/jem.20112322.
- [62] A. Brill, T.A. Fuchs, A.S. Savchenko, G.M. Thomas, K. Martinod, S.F. de Meyer, A.A. Bhandari, D.D. Wagner, Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice, *J. Thromb. Haemost.* 10 (2012) 136–144. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x.
- [63] E. Ramacciotti, A.E. Hawley, D.M. Farris, N.E. Ballard, S.K. Wroblewski, D.D. Myers, P.K. Henke, T.W. Wakefield, Leukocyte- and platelet-derived microparticles correlate with thrombus weight and tissue factor activity in an experimental mouse model of venous thrombosis, *Thromb. Haemost.* 101 (2009) 748–754. doi:10.1160/TH08-09-0620.
- [64] S.S. Anand, Smoking, *Circulation.* 135 (2017) 17–20. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025024.
- [65] E. Previtali, P. Bucciarelli, S.M. Passamonti, I. Martinelli, Risk factors for venous and arterial thrombosis., *Blood Transfus.* 9 (2011) 120–38. doi:10.2450/2010.0066-10.
- [66] F.R. Rosendaal, P.H. Reitsma, Genetics of venous thrombosis, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 301–304. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03394.x.
- [67] S. Montoro-García, M. Schindewolf, S. Stanford, O.H. Larsen, T. Thiele, The Role of Platelets in Venous Thromboembolism, *Semin. Thromb. Hemost.* 42 (2016) 242–51. doi:10.1055/s-0035-1570079.
- [68] G. de Gaetano, I. Santimone, F. Gianfagna, L. Iacoviello, C. Cerletti, Variability of Platelet Indices and Function: Acquired and Genetic Factors, in: 2012: pp. 395–434. doi:10.1007/978-3-642-29423-5_16.
- [69] H. Jensvoll, K. Blix, S.K. Brækkan, J.-B. Hansen, Platelet count measured prior to cancer development is a risk factor for future symptomatic venous thromboembolism: the tromsø study., *PLoS One.* 9 (2014) e92011. doi:10.1371/journal.pone.0092011.
- [70] R. Simanek, R. Vormittag, C. Ay, G. Alguel, D. Dunkler, I. Schwarzingler, G. Steger, U. Jaeger, C. Zielinski, I. Pabinger, High platelet count associated with venous thromboembolism in cancer patients: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS)., *J. Thromb. Haemost.* 8 (2010) 114–20.
- [71] M. Mandalà, S. Barni, M. Prins, R. Labianca, C. Tondini, L. Russo,

- A. Milesi, M. Cremonesi, M. Zaccanelli, C. Regonesi, C. Moro, A. Falanga, Acquired and inherited risk factors for developing venous thromboembolism in cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: a prospective trial., *Ann. Oncol.* 21 (2010) 871–6.
- [72] A.A. Khorana, C.W. Francis, E. Culakova, G.H. Lyman, Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study., *Cancer.* 104 (2005) 2822–9.
- [73] S.K. Braekkan, E.B. Mathiesen, I. Njølstad, T. Wilsgaard, J. Størmer, J.B. Hansen, Mean platelet volume is a risk factor for venous thromboembolism: the Tromsø Study, Tromsø, Norway., *J. Thromb. Haemost.* 8 (2010) 157–62. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03498.x.
- [74] A.W. Tsai, M. Cushman, W.D. Rosamond, S.R. Heckbert, R.P. Tracy, N. Aleksic, A.R. Folsom, Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE)., *Am. J. Med.* 113 (2002) 636–42.
- [75] N.A. Zakai, J. Wright, M. Cushman, Risk factors for venous thrombosis in medical inpatients: validation of a thrombosis risk score., *J. Thromb. Haemost.* 2 (2004) 2156–61. doi:10.1111/j.1538-7836.2004.00991.x.
- [76] P. Ferroni, F. Guadagni, S. Riondino, I. Portarena, S. Mariotti, F. La Farina, G. Davì, M. Roselli, Evaluation of mean platelet volume as a predictive marker for cancer-associated venous thromboembolism during chemotherapy., *Haematologica.* 99 (2014) 1638–44.
- [77] J. Rupa-Matysek, L. Gil, R. Kroll-Balcerzak, M. Barańska, M. Komarnicki, Mean platelet volume as a predictive marker for venous thromboembolism and mortality in patients treated for diffuse large B-cell lymphoma., *Hematol. Oncol.* (2016). doi:10.1002/hon.2321.
- [78] P. Harrison, M.S. Robinson, I.J. Mackie, S.J. Machin, Reticulated platelets., *Platelets.* 8 (1997) 379–383.
- [79] M. Buttarello, M. Plebani, Automated blood cell counts: state of the art., *Am. J. Clin. Pathol.* 130 (2008) 104–16. doi:10.1309/EK3C7CTDKNVPXVTN.
- [80] M. Weber, F. Gerdson, K. Gutensohn, V. Schoder, B. Eifrig, D.K. Hossfeld, Enhanced platelet aggregation with TRAP-6 and collagen

- in platelet aggregometry in patients with venous thromboembolism, *Thromb. Res.* 107 (2002) 325–328. doi:10.1016/S0049-3848(02)00351-1.
- [81] M.K. Puurunen, S.-J. Hwang, C.J. O'Donnell, G. Tofler, A.D. Johnson, Platelet function as a risk factor for venous thromboembolism in the Framingham Heart Study., *Thromb. Res.* 151 (2017) 57–62. doi:10.1016/j.thromres.2017.01.010.
- [82] C. Meisel, J.A. López, K. Stangl, Role of platelet glycoprotein polymorphisms in cardiovascular diseases., *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 369 (2004) 38–54. doi:10.1007/s00210-003-0828-y.
- [83] A.P. Reiner, D.S. Siscovick, F.R. Rosendaal, Platelet glycoprotein gene polymorphisms and risk of thrombosis: facts and fancies., *Rev. Clin. Exp. Hematol.* 5 (2001) 262–87–2.
- [84] J.M. Soria, El componente genético de las alteraciones de la coagulación y de la trombosis, *Rev. Española Cardiol.* 9 (2009) 58–65.
- [85] A.D. Johnson, The genetics of common variation affecting platelet development, function and pharmaceutical targeting., *J. Thromb. Haemost.* 9 Suppl 1 (2011) 246–57. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04359.x.
- [86] G. Pilia, W.M. Chen, A. Scuteri, M. Orrú, G. Albai, M. Dei, S. Lai, G. Usala, M. Lai, P. Loi, C. Mameli, L. Vacca, M. Deiana, N. Olla, M. Masala, A. Cao, S.S. Najjar, A. Terracciano, T. Nedorezov, A. Sharov, A.B. Zonderman, G.R. Abecasis, P. Costa, E. Lakatta, D. Schlessinger, Heritability of cardiovascular and personality traits in 6,148 Sardinians, *PLoS Genet.* 2 (2006) 1207–1223. doi:10.1371/journal.pgen.0020132.
- [87] F. Marroni, D. Grazio, C. Pattaro, M. Devoto, P. Pramstaller, Estimates of genetic and environmental contribution to 43 quantitative traits support sharing of a homogeneous environment in an isolated population from South Tyrol, Italy., *Hum. Hered.* 65 (2008) 175–82. doi:10.1159/000109734.
- [88] M. Traglia, C. Sala, C. Masciullo, V. Cverhova, F. Lori, G. Pistis, S. Bione, P. Gasparini, S. Ulivi, M. Ciullo, T. Nutile, E. Bosi, M. Sirtori, G. Mignogna, A. Rubinacci, I. Buetti, C. Camaschella, E. Petretto, D. Toniolo, Heritability and demographic analyses in the large

- isolated population of val borbera suggest advantages in mapping complex traits genes, *PLoS One.* 4 (2009). doi:10.1371/journal.pone.0007554.
- [89] G. Biino, C.L. Balduini, L. Casula, P. Cavallo, S. Vaccargiu, D. Parracciani, D. Serra, L. Portas, F. Murgia, M. Pirastu, Analysis of 12,517 inhabitants of a sardinian geographic isolate reveals that predispositions to thrombocytopenia and thrombocytosis are inherited traits, *Haematologica.* 96 (2011) 96–101. doi:10.3324/haematol.2010.029934.
- [90] P.F. Bray, R.A. Mathias, N. Faraday, L.R. Yanek, M.D. Fallin, J.E. Herrera-Galeano, A.F. Wilson, L.C. Becker, D.M. Becker, Heritability of platelet function in families with premature coronary artery disease., *J. Thromb. Haemost.* 5 (2007) 1617–23. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02618.x.
- [91] J.B. Whitfield, N.G. Martin, D.C. Rao, Genetic and environmental influences on the size and number of cells in the blood, *Genet. Epidemiol.* 2 (1985) 133–144. doi:10.1002/gepi.1370020204.
- [92] D.M. Evans, I.H. Frazer, N.G. Martin, Genetic and environmental causes of variation in basal levels of blood cells., *Twin Res.* 2 (1999) 250–257.
- [93] L. Vila, A. Martinez-Perez, M. Camacho, A. Buil, S. Alcolea, N. Pujol-Moix, M. Soler, R. Antón, J.-C. Souto, J. Fontcuberta, J.-M. Soria, Heritability of thromboxane A2 and prostaglandin E2 biosynthetic machinery in a Spanish population., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 128–34. doi:10.1161/ATVBAHA.109.193219.
- [94] C. Garner, T. Tatu, J.E. Reittie, T. Littlewood, J. Darley, S. Cervino, M. Farrall, P. Kelly, T.D. Spector, S.L. Thein, Genetic influences on F cells and other hematologic variables: a twin heritability study., *Blood.* 95 (2000) 342–6.
- [95] P. Harrison, Platelet function analysis., *Blood Rev.* 19 (2005) 111–123.
- [96] E.J. Favaloro, Utility of the PFA-100 for assessing bleeding disorders and monitoring therapy: a review of analytical variables, benefits and limitations., *Haemophilia.* 7 (2001) 170–9.

- [97] E.J. Favalaro, Clinical application of the PFA-100., *Curr. Opin. Hematol.* 9 (2002) 407–15.
- [98] M. Crescente, A.M. Mezzasoma, M. Del Pinto, F. Palmerini, A. Di Castelnuovo, C. Cerletti, G. De Gaetano, P. Gresele, Incomplete inhibition of platelet function as assessed by the platelet function analyzer (PFA-100) identifies a subset of cardiovascular patients with high residual platelet response while on aspirin, *Platelets.* 22 (2011) 179–87.
- [99] V.L. Serebruany, A. Malinin, S. Ong, D. Atar, Patients with metabolic syndrome exhibit higher platelet activity than those with conventional risk factors for vascular disease., *J. Thromb. Thrombolysis.* 25 (2008) 207–13. doi:10.1007/s11239-007-0047-3.
- [100] I. Fuchs, M. Frossard, A. Spiel, E. Riedmüller, A.N. Laggner, B. Jilma, Platelet function in patients with acute coronary syndrome (ACS) predicts recurrent ACS, *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 2547–2552. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02239.x.
- [101] L. Martin-Fernandez, A. Ziyatdinov, M. Carrasco, J.A. Millon, A. Martinez-Perez, N. Vilalta, H. Brunel, M. Font, A. Hamsten, J.C. Souto, J.M. Soria, Genetic Determinants of Thrombin Generation and Their Relation to Venous Thrombosis: Results from the GAIT-2 Project, *PLoS One.* 11 (2016) e0146922. doi:10.1371/journal.pone.0146922.
- [102] N. Pujol-Moix, M. Vázquez-Santiago, A. Morera, A. Ziyatdinov, A. Remacha, J.F. Nomdedeu, J. Fontcuberta, J.M. Soria, J.C. Souto, Genetic determinants of Platelet Large-Cell Ratio, Immature Platelet Fraction, and other platelet-related phenotypes, *Thromb. Res.* 136 (2015) 361–366. doi:10.1016/j.thromres.2015.06.016.
- [103] J. Blangero, L. Almasy, Multipoint oligogenic linkage analysis of quantitative traits., *Genet. Epidemiol.* 14 (1997) 959–64.
- [104] J.M.P. Pekelharing, O.H. Aüss, R.D.J. Onge, J.L. Okhoff, J.S. Odikromo, M.S. Paans, R.B. Rouwer, S.D.L. Athouder, R.H. Inzmann, Haematology Reference Intervals for Established and Novel Parameters in Healthy Adults, *Sysmex J. Int.* 20 (2010) 1–9.
- [105] R. Paniccia, R. Priora, A.A. Liotta, R. Abbate, Platelet function tests: a comparative review., *Vasc. Health Risk Manag.* 11 (2015) 133–48.

doi:10.2147/VHRM.S44469.

- [106] E.F. Mammen, P.C. Comp, R. Gosselin, C. Greenberg, W.K. Hoots, C.M. Kessler, E.C. Larkin, D. Liles, D.J. Nugent, PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction., *Semin. Thromb. Hemost.* 24 (1998) 195–202. doi:10.1055/s-2007-995840.
- [107] P. Harrison, Assessment of platelet function in the laboratory., *Hamostaseologie.* 29 (2009) 25–31.
- [108] F. Galton, Regression towards mediocrity in hereditary stature., *J. Anthropol. Inst. Gt.* 15 (1886) 246–263.
- [109] Y. Xin, S. Xiaogang, Simple Linear Regression, in: *Linear Regres. Anal.*, World Scientific, Singapore, 2009: pp. 9–39. doi:10.1142/9789812834119_0002.
- [110] R.D. Cook, S. Weisberg, Criticism and Influence Analysis in Regression, *Sociol. Methodol.* 13 (1982) 313. doi:10.2307/270724.
- [111] Y. Xin, S. Xiaogang, Multiple Linear Regression, in: *Linear Regres. Anal.*, World Scientific, Singapore, 2009: pp. 41–127. doi:10.1142/9789812834119_0003.
- [112] M. Lynch, B. Welsh, Estimation of breeding values, in: M. Lynch, B. Welsh (Eds.), *Genet. Anal. Quant. Trait.*, 1a. Ed., Sinauer Associated, Sunderland, 1998: pp. 745–778.
- [113] M. Vázquez-Santiago, A. Ziyatdinov, N. Pujol-Moix, H. Brunel, A. Morera, J.M. Soria, J.C. Souto, Age and gender effects on 15 platelet phenotypes in a Spanish population, *Comput. Biol. Med.* 69 (2016) 226–233. doi:10.1016/j.combiomed.2015.12.023.
- [114] J.A. Nelder, R.W.M. Wedderburn, Generalized Linear Models, *J. R. Stat. Soc. A.* 135 (1972) 370–384. doi:10.1080/01621459.2000.10474340.
- [115] Y. Xin, S. Xiaogang, Generalized Linear Models, in: *Linear Regres. Anal.*, World Scientific, Singapore, 2009: pp. 269–295. doi:10.1142/9789812834119_0008.
- [116] R. Ihaka, R. Gentleman, R: A Language for Data Analysis and Graphics, *J. Comput. Graph. Stat.* 5 (1996) 299–314. doi:10.2307/1390807.
- [117] D. Bates, M. Mächler, B. Bolker, S. Walker, Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4., (2014) 51.

- [118] A. Kuznetsova, P.B. Brockhoff, C. Rune Haubo Bojesen, Tests for random and fixed effects for linear mixed effect models (lmer objects of lme4 package), (2014). <http://cran.r-project.org/web/packages/lmerTest/>.
- [119] A. Ziyatdinov, H. Brunel, A. Martinez-Perez, A. Buil, A. Perera, J.M. Soria, solarius: an R interface to SOLAR for variance component analysis in pedigrees, *Bioinformatics*. 32 (2016) 1901–1902. doi:10.1093/bioinformatics/btw080.
- [120] A. Ziyatdinov, M. Vazquez-Santiago, H. Brunel, A. Martinez-Perez, H. Aschard, J.M. Soria, lme4qtl: linear mixed models with flexible covariance structure for genetic studies of related individuals, *bioRxiv*. (2017).
- [121] P.W. Kamphuisen, J.C. Eikenboom, R.M. Bertina, Elevated factor VIII levels and the risk of thrombosis., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 731–738. doi:10.1161/01.ATV.21.5.731.