

**¿Existe una predisposición genética a padecer
trombosis?**

Prof. Vicente Vicente García

Índice

I. Introducción

II. Hemorragia y trombosis, manifestaciones clínicas de enfermedades hereditarias

III. La enfermedad tromboembólica

- Trombosis venosa y arterial, un mismo destino pero por caminos distintos

IV. Trombosis venosa

- ¿Es la trombosis venosa hereditaria y producto de una alteración monogénica?
- El inicio de una nueva era. La trombosis venosa como enfermedad poligénica
 - Factor V Leiden
 - Protrombina 20210 A/G
- Variabilidad fenotípica en trombofilia. Ejemplo de su carácter multigénico y multifactorial

V. Variabilidad polimórfica del sistema hemostático

- Procedimientos metodológicos para establecer la relación de un polimorfismo genético y el riesgo de trombosis
 - Estudios de asociación
 - Estudios de vinculación

VI. Polimorfismos genéticos y trombosis arterial

- Polimorfismos genéticos que afectan a los receptores adhesivos plaquetarios y que se han asociado a riesgo trombótico arterial
- Polimorfismos genéticos que afectan a proteínas del sistema de coagulación y se han asociado a riesgo trombótico arterial
- Polimorfismos genéticos que afectan a proteínas no pertenecientes al sistema hemostático pero que se han asociado a riesgo trombótico arterial
- ¿ Nos aporta información el estudio de los polimorfismos genéticos para definir el riesgo trombótico arterial ?

VII. Significado evolutivo de los polimorfismos genéticos del sistema hemostático. ¿Nos aportan los polimorfismos protrombóticos algún beneficio?

VIII. Farmacogenética y sistema hemostático

IX. Bibliografía

I. Introducción

El sistema hemostático es un complejo mecanismo de defensa del organismo que tiene numerosas funciones, entre las que sobresalen las de mantener permeable la luz vascular, establecer el tapón hemostático en caso de lesión vascular y, en caso de producirse una obstrucción por un coágulo de fibrina, generar su lisis. De una forma bastante simplificada se entiende que este sistema tiene dos compartimentos: uno de carácter celular, integrado fundamentalmente por plaquetas y endotelio; el otro, de carácter plasmático, donde participan proteínas con actividad procoagulante generadoras de fibrina en el sistema enzimático de la coagulación sanguínea, otras conocidas como inhibidores que modulan el sistema anterior y, finalmente, las que inducen actividad fibrinolítica, cuyo cometido es el de limpiar de fibrina el lecho vascular en caso de activación del sistema de la coagulación sanguínea. La función, interacción y regulación entre los componentes celulares y proteínas que participan en este amplio, complejo y dinámico proceso ha sido estudiado extensamente y podemos encontrar revisiones recientes (1,2), pero aunque ya se ha alcanzado un notable entendimiento del funcionamiento del sistema hemostático en modelos “in vitro”, el conocimiento detallado de su integración funcional “in vivo” sigue siendo un auténtico reto.

En las décadas de los años setenta y ochenta se desveló la estructura y función de una buena parte de las proteínas implicadas en el sistema hemostático, así como el papel de los receptores adhesivos plaquetarios y sus mecanismos de interacción con el subendotelio vascular. El avance está siendo mucho más espectacular con el conocimiento de los genes codificantes de esas proteínas, lo que está permitiendo establecer la base molecular que define las enfermedades hereditarias que afectan al sistema hemostático, las trombopatías y coagulopatías congénitas por una parte, y los estados de trombofilia hereditaria por otra (3,4). El conocimiento de las pequeñas modificaciones genéticas frecuentes en la población (>1%), conocidas como polimorfismos genéticos, ha abierto una nueva puerta para profundizar en el conocimiento de la regulación del sistema hemostático, lo que está ayudando a entender hechos como la tendencia genética a sufrir episodios trombóticos o manifestaciones hemorrágicas, tal como sugería desde hace años la mera experiencia clínica.

Además, es bien conocido que existen unos claros factores ambientales, en sentido amplio del término, que se asocian a un riesgo manifiesto de padecer un episodio tromboembólico (5,6). A lo largo de estas páginas vamos a reflejar algunas de las contribuciones de nuestro grupo de trabajo a éste área y confrontarlas con los datos que se están generando. Asimismo podremos poner en

evidencia cómo ha variado el concepto de enfermedad tromboembólica en muy pocos años, pasando de ser considerada como enfermedad eminentemente monogénica, a ser ya un claro ejemplo de proceso multigénico, donde la interacción o diálogo entre genes y de genes-factores ambientales es muy intenso y dinámico a lo largo de la vida. Veremos cómo esa interacción génica participa activamente en la definición del riesgo de sufrir la expresión clínica de una de las dos vertientes del desequilibrio hemostático, la hemorragia o la trombosis.

II. Hemorragia y trombosis; manifestaciones clínicas de enfermedades hereditarias

En la historia de los logros alcanzados en el conocimiento del sistema hemostático es curioso observar cómo ha existido una importante diferencia entre lo que se interpretó desde muy antiguo como una clara manifestación de un defecto de este sistema de defensa, la hemorragia, y la muy tardía vinculación del fenómeno trombótico también como expresión de una alteración del sistema hemostático. Ya en los primeros vestigios de nuestra civilización la hemorragia era un hecho connatural a la vida, como podemos comprobar mirando las pinturas rupestres del Paleolítico en las cuevas de Altamira, o bien los dibujos ornamentales de vasijas de civilizaciones antiguas. Por el contrario, la primera referencia histórica de enfermedad tromboembólica, un caso de trombosis venosa en una extremidad inferior, no aparece hasta el siglo XIII, cuyo dibujo forma parte del elegante e ilustrado manuscrito que relata los milagros de San Luis (Luis IX) en un documento archivado en la Biblioteca Nacional Francesa (7).

Por otra parte, también ha existido una notable diferencia en cuanto a la idea del carácter hereditario de algunas complicaciones hemorrágicas o trombóticas. En el Talmud judío hay una clara alusión de la enfermedad que conocemos como hemofilia (hemorra-filia, amigo o frecuentador de hemorragias) como enfermedad congénita de carácter hereditario. Ya se hacía especial hincapié de que el tercer hijo varón de una misma madre, de la que sus dos primeros hijos habían fallecido por hemorragias en el acto de la circuncisión, estaba exento de ser sometido a este ritual (8). Es sorprendente que la primera sospecha del carácter hereditario de la enfermedad tromboembólica no apareciera hasta 1956 (7), si bien el término de trombofilia hereditaria tarda en asentarse algunos años más. En definitiva más de 20 siglos separan el concepto de enfermedad hemorrágica y enfermedad trombótica como formas de expresión de hechos clínicos de carácter hereditario.

La justificación de las diferencias “históricas” en la descripción detallada de las manifestaciones hemorrágicas y trombóticas, al margen de la evidente simplicidad/dificultad diagnóstica entre ellas (hemorragia versus trombosis), posiblemente no ha sido fruto exclusivamente de observaciones y descripciones más o menos agudas y diligentes, sino muy posiblemente de su frecuencia. Hoy es mucho más frecuente la trombosis, pero esa circunstancia era muy distinta en épocas pasadas. Como veremos más adelante, ese cambio radical pueda explicarse por el notable cambio en los hábitos de vida, pasando de una sociedad activa físicamente, y con una expectativa de vida que no sobrepasaba los 40 años, a otra muy diferente donde predomina el sedentarismo, un hábito alimentario muy distinto y donde la esperanza media de vida se ha duplicado. No es extraño descartar que pequeñas modificaciones genéticas (polimorfismos) experimentadas en nuestras secuencias codificantes de proteínas implicadas en el sistema hemostático para prevenirnos de los “inconvenientes” (protección a la hemorragia) de una determinada civilización, puedan volverse contra nosotros (favorecer la trombosis) al cambiar drásticamente nuestro sistema y expectativas de vida. Más adelante volveremos sobre este interesante asunto.

III. La enfermedad tromboembólica

Trombosis venosa y arterial, un mismo destino pero por caminos distintos

La enfermedad tromboembólica es la principal causa de muerte en todo el mundo y su relevancia es mayor en países desarrollados, donde puede llegar a ser responsable de más del 27% de las muertes (10). Por esa razón, durante los últimos 30 años se han hecho importantes esfuerzos en el área de la investigación científica en hemostasia para la identificación de cambios moleculares y bioquímicos que pudiesen explicar la existencia de un estado de hipercoagulabilidad permanente. Un amplio concepto de enfermedad tromboembólica incluye las trombosis de localización venosa y arterial (11). La trombosis venosa corresponde a la oclusión del lecho vascular venoso, frecuentemente en extremidades inferiores, que puede verse acompañado de una grave complicación como es el embolismo pulmonar. En países occidentales la trombosis venosa profunda (TVP) se presenta anualmente en 1-2 personas por 1.000 habitantes, con una supervivencia a los 90 días del episodio del 69% (12). Si nos fijamos en personas con edades que superan los 65 años, la aparición de trombosis venosa profunda es superior a 1 por 100 individuos/año.

Como trombosis arterial entendemos todos los procesos oclusivos que tienen lugar en árbol vascular no venoso, siendo los de mayor frecuencia los que aparecen en vasos coronarios (isquemia coronaria/infarto de miocardio), cerebrovasculares (accidentes isquémicos transitorios o permanentes, infarto cerebral) y la oclusión vascular periférica. Estos cuadros, muchos más frecuentes que la trombosis venosa profunda, están a la cabeza de las causas de mortalidad en los países económicamente más avanzados.

Si bien el evento último en la trombosis venosa y arterial es similar, la oclusión vascular por un trombo, el mecanismo patogenético responsable en los dos casos es muy diferente, lo que justifica que se tenga que abordar su estudio con estrategias distintas.

En la TVP el trombo es muy rico en fibrina, con un amplio contenido de elementos sanguíneos atrapados en esa malla o red - trombo "rojo"-, y con una pared vascular donde no hay lesiones específicas que puedan establecerse como causa directa de la aparición del trombo. El mecanismo principal se atribuye a un exceso de activación del sistema de la coagulación sanguínea, bien por hiperactividad de función de los factores procoagulantes, o bien por una deficiencia de los mecanismos reguladores (inhibidores del sistema hemostático y/o del sistema fibrinolítico). Por este motivo, desde hace muchos años la profilaxis indicada para evitar la aparición o propagación de la trombosis venosa profunda es la terapia anticoagulante, que impide o limita la generación de trombina.

Tradicionalmente se ha establecido que la aparición de trombosis venosa profunda está relacionada con numerosos factores ambientales como inmovilización, obesidad, estasis venoso que puede estar ocasionado por la insuficiencia venosa (varices) o embarazo, cirugía abdominal, cáncer, toma de anticonceptivos orales, etc. (6).

En cuanto a la trombosis arterial, su mecanismo patogenético y los factores de riesgo de carácter ambiental discrepan bastante de los indicados para la TVP. El contenido del trombo arterial es rico en plaquetas, con poca retención de elementos celulares sanguíneos, de ahí que clásicamente se definiera el trombo como "blanco". A diferencia de la trombosis venosa, observamos habitualmente una lesión constante de pared arterial, que corresponde a arterosclerosis. En esencia, el mecanismo patogenético de la oclusión vascular arterial se centra en una adhesión plaquetaria a la superficie vascular lesionada, seguido de una activación celular que desencadena el fenómeno de agregación plaquetaria y la concomitante generación de trombina "in situ", responsable de la

oclusión final. Por ello, a diferencia de la TVP, los fármacos donde se apoya en gran medida la estrategia antitrombótica arterial son los que tienen actividad antiagregante plaquetaria (13).

Los factores de riesgo ambientales para la trombosis arterial también son ampliamente distintos de los característicos de la TVP: fumar, hipertensión, dislipemia, diabetes, hiperhomocisteinemia y cambios locales de la pared vascular, junto a otros, son los elementos característicos que predisponen a la trombosis arterial (5).

Todo lo indicado justifica que la aproximación al estudio de la trombosis arterial y venosa siga caminos y estrategias diferentes. Si desde un principio estuvo claro que la trombosis venosa estaba vinculada a un problema del sistema hemostático, donde podían influir factores ambientales, en la oclusión arterial se pensó durante mucho tiempo que el evento trombotico prácticamente no existía y que todo giraba en torno a la lesión de pared vascular, ampliamente influida en su crecimiento por el efecto a largo plazo de factores ambientales.

Con la explosión de conocimientos que está aportando la genética molecular se están consiguiendo notables avances en el entendimiento del mecanismo patogénico de la trombosis, tanto arterial como venosa, lo que indudablemente traerá consigo una mejor adecuación de medidas profilácticas y terapéuticas de esta frecuente complicación. Para poder entender mejor lo que estamos proponiendo, nos referiremos a las aportaciones recientes de la genética en el conocimiento del fenómeno trombotico.

IV. Trombosis Venosa

¿Es la trombosis venosa hereditaria y producto de una alteración monogénica?

El término trombofilia, nacido para definir la tendencia a desarrollar episodios de trombosis venosa entre sujetos de la misma familia, fue establecido en 1956 por Jordan y Nandorff (7). No obstante, hasta 1965 no se caracterizó el primer defecto del sistema hemostático, una deficiencia de antitrombina (AT) asociada a tromboembolismo venoso en bastantes miembros de una familia (14). La definición de trombofilia implica necesariamente la existencia de alteraciones genéticas de carácter hereditario, que afectando a distintos elementos del sistema hemostático incrementan el riesgo de sufrir trastornos tromboticos venosos. Junto a la anomalía de la AT, en la década de los años ochenta se identificaron otras deficiencias hereditarias, tanto cuantitativas como cualitativas de proteínas inhibitoras del sistema de la coagulación sanguínea, como son la proteína C (PC) y

proteína S (PS) (15). Durante ese periodo comenzó a plantearse la TVP como enfermedad monogénica y era bastante razonable pensar que la pérdida de los sistemas anticoagulantes del organismo condicionaba la presentación clínica de estados trombofílicos más o menos severos.

Antes de seguir adelante revisaremos las características de esas anomalías y abordaremos cuestiones que nos permitan responder algunas preguntas de interés: ¿Cuáles son esas deficiencias? ¿Conocemos la frecuencia de las alteraciones moleculares? ¿Son suficientes para explicar el alto número de enfermos con TVP? ¿Son las deficiencias descritas también responsables de trombosis arterial?

Diferentes proteínas anticoagulantes ejercen su función en la regulación del proceso de coagulación, inhibiendo la actividad serín-proteasa de diversos factores procoagulantes. El primer inhibidor descrito fue la antitrombina (AT). La actividad anticoagulante de esta proteína es amplia, dado que es capaz de inhibir a múltiples serín-proteasas de la cascada de la coagulación: trombina, los factores IXa, Xa, XIa y XIIa, kalikreína y plasmina. La deficiencia heterocigota de AT es un defecto poco frecuente en pacientes con trombosis venosa (<1%), pero su efecto trombótico es elevado (riesgo de 20 veces) ya que su frecuencia en población normal es realmente baja (0,05-0,02%) (16). La deficiencia homocigota de AT es incompatible con la vida.

Como ocurre en las deficiencias de proteína S o C que comentaremos más adelante, existen dos grandes tipos de deficiencia de AT. El tipo I se caracteriza por reducción en los niveles funcionales y antigénicos de la proteína, mientras que el tipo II se caracteriza por un defecto sólo funcional. Se han identificado más de 40 alteraciones genéticas distintas de AT (3, 17).

El sistema de la proteína C (PC) es una ruta de anticoagulación natural también muy importante, que regula la actividad de los factores activados Va y VIIIa, cofactores claves en la formación de trombina, y por tanto, en el proceso de coagulación. La propia trombina una vez generada es capaz de activar el sistema de la PC en la superficie de las células endoteliales, mediante una acción proteolítica que resulta en la generación de la forma activada de la PC (PCa). La PCa inhibe la coagulación gracias a su actividad proteasa que inactiva los cofactores Va y VIIIa. Las reacciones proteolíticas catalizadas por la PCa son potenciadas por otra proteína clave en el sistema de la PC, la proteína S, que actúa como cofactor no enzimático.

La deficiencia heterocigota de PC es responsable del 2-3% de pacientes con trombosis venosa (16), y se encuentra en 0,3-0,5% de individuos sanos. Los portadores heterocigotos de esta anomalía tienen 10 veces más riesgo de sufrir complicaciones trombóticas. Es importante destacar que hasta el

momento se han identificado más de 160 alteraciones genéticas diferentes responsables de deficiencia de PC (3). La mayor parte de las alteraciones genéticas (más del 90%) se han descrito en deficiencias de PC tipo I (deficiencia antigénica y funcional), mientras que solo un 10% se han encontrado en deficiencias de tipo II (asociadas a moléculas de PC funcionalmente anómalas). Nuestro grupo participó en la primera caracterización y descripción de la anomalía genética de PC (18). La deficiencia homocigota o heterocigota compuesta, que ocasiona un defecto completo de PC, es un trastorno genético muy poco frecuente, y se asocia con coagulopatías neonatales que ocasionan una púrpura fulminante con lesiones en la piel, coagulación intravascular diseminada y, potencialmente, daño cerebral irreversible.

La proteína S se encuentra en plasma en dos formas, una libre (40%) y otra asociada a la proteína de unión de C4b, un regulador de sistema del complemento. Sólo la forma libre de PS puede actuar como cofactor y potenciar la actividad anticoagulante de la proteína C activada. Al igual que para la deficiencia de PC, el déficit heterocigoto de PS se ha identificado en 2-3% de pacientes con trombosis venosa (15,16). Curiosamente, aún no se conoce con precisión la prevalencia de esta alteración en la población general, por lo que no podemos definir exactamente el riesgo trombótico asociado a este defecto, si bien se sugiere que podría ser similar al de la deficiencia de PC (15). La deficiencia de PS tipo I se caracteriza por la reducción en los niveles de PS libre y total (20). La disminución significativa de PS libre asociada a niveles normales de PS total podría constituir una nueva entidad de deficiencia de PS denominada de tipo III. Sin embargo, la reciente demostración de coexistencia del tipo I y III en varias familias con deficiencia de PS sugiere que estos dos tipos pudieran ser variantes fenotípicas de las mismas alteraciones genéticas (21). Hasta el momento se han caracterizado más de 80 alteraciones genéticas diferentes asociadas a deficiencia de PS, la mayoría asociadas a deficiencias de tipo I (3).

Las manifestaciones y características clínicas de las alteraciones de AT, PC y PS son similares, definidas por episodios trombóticos en territorio venoso, ocasionalmente en localizaciones poco frecuentes (mesentéricas, cerebrales, etc.), preferentemente de aparición en edades jóvenes (<45 años), no estando precedidas la mayoría de ellas por factores desencadenantes, y con un carácter familiar manifiesto. No existe ningún rasgo diferenciador entre deficiencias.

Se han realizado numerosos estudios para ver si anomalías de AT, PC y PS, podían guardar relación con la aparición de trombosis arterial. Los resultados muestran la falta de evidencia para establecer relación alguna entre anomalías de AT, PC y PS y un mayor riesgo trombótico arterial,

hecho que subraya una vez más las importantes diferencias entre la patogénesis de trombosis venosa y arterial (15,31).

En definitiva, al inicio de los años noventa se podía establecer que el 5-6% de los primeros episodios tromboticos venosos que sufre la población no seleccionada es de carácter hereditario (15,16). Se pensaba que la TVP podía ser en gran medida expresión de trastornos monogénicos, si bien se esperaba encontrar nuevas mutaciones genéticas en otras proteínas que justificasen las observaciones clínicas de trombosis familiar todavía no explicadas. En esas fechas se dejaba más del 90% de las TVP sin una vinculación o “responsabilidad” genética. Como era de esperar, cuando los estudios se realizan en poblaciones seleccionadas (primer episodio trombotico en edades jóvenes, enfermos con episodios recidivantes tromboticos, pacientes procedentes de familias con clara historia de trombosis venosa, etc.) la identificación de estas anomalías se eleva muy considerablemente.

El inicio de una nueva era. La trombosis venosa como enfermedad poligénica.

En 1993 el grupo del sueco Bjorg Dahlbäck encontró en un grupo de familias con clara historia de trombosis venosa profunda, que algunos individuos que habían sufrido un episodio tromboembólico venoso tenían una peculiaridad biológica, como es la de no alargarse el tiempo de tromboplastina parcial activado cuando se añadía PCa, que debería ejercer una clara acción anticoagulante. Ese fenómeno no se presentaba en la mayor parte de los controles. El nuevo fenotipo biológico fue denominado Resistencia a la Proteína C activada (RPCa) (22). Unos meses más tarde el grupo de Rogier Bertina, de Leiden, encontró la explicación a ese fenotipo biológico, al comprobar que en más del 95% de los casos ese raro comportamiento era secundario a una nueva mutación de elevada frecuencia en el gen codificante del Factor V de la coagulación sanguínea, que ocasionaba un cambio de aminoácido que hacía resistente al FV a la proteólisis por parte de la PCa (23).

El hallazgo abrió definitivamente el concepto restringido que se tenía de trombofilia hereditaria. Además, el ser una variante genética frecuente en la población (polimorfismo genético), despertó el interés por encontrar nuevos polimorfismos que pudiesen asociarse con un mayor riesgo de TVP. De esta forma, durante la última década cambió de forma rotunda el concepto de trombofilia, que de ser considerada una enfermedad monogénica a enfermedad poligénica y multifactorial. Por otra parte, surgió el interés para investigar las diferentes posibilidades de interacción génica y se precipitó igualmente el inicio de estudios de interacción gen-factores

ambientales. Afortunadamente, con estas nuevas estrategias estamos asistiendo a un continuo avance en la explicación de un fenómeno dinámico y complejo como es la enfermedad tromboembólica.

Antes de analizar el camino recorrido en estos últimos años es conveniente considerar, con un poco más de detenimiento, los dos polimorfismos -Factor V Leiden y la Protrombina 20210A/G- responsables en gran medida de la actividad iniciada en éste área de la medicina.

Factor V Leiden. Como ya hemos indicado, Dahlbäck y colaboradores desarrollaron una técnica que permite identificar alteraciones relacionadas con la PCa (22). Cuando este ensayo se llevó a cabo en 104 pacientes con trombosis venosa, se constató una elevada prevalencia de resistencia a la PCa (33%) comparado con el de individuos sanos (8%). El grupo del Dr. Bertina demostró que el fenotipo de resistencia a la PCa se asociaba en más del 95% de los casos, con una mutación puntual A/G 1691, en el exón 10 del gen del FV. El cambio nucleotídico ocasiona la sustitución de arginina por glutamina en la posición 506 que afecta al residuo más importante en la inactivación del FVa por la PCa. La variante genética se conoció como FV Leiden (FVL) (23). El descenso en el nivel de inactivación del FVa se traduce en un aumento en la generación de trombina, y por tanto genera un mayor estado procoagulante.

La alteración genética responsable del FVL debe ser considerada como un polimorfismo, ya que está presente en más del 1% de la población sana. Curiosamente, el cambio genético se ha encontrado sólo en población caucasiana y no se ha descrito en las poblaciones indígenas de Asia, África, América o Australia. En población caucasiana, la prevalencia de este polimorfismo se ha estimado entre el 3%-5%, si bien varía de unas regiones a otras. Así, en regiones del norte de Europa este polimorfismo se encuentra hasta en el 12% de la población, mientras que en regiones del sur de Europa la frecuencia desciende al 4% (25,26). La alta incidencia de tromboembolismo venoso en Occidente comparada con la encontrada en Asia o Africa, se ha considerado que es debida, al menos en parte, a la diferente prevalencia del FVL. El estudio del haplotipo del gen del FV en portadores homocigotos de FVL demostró que el cambio Arg506Glu ocurrió hace 21.000-34.000 años, y fue introduciéndose en la población caucasiana hasta conseguir la frecuencia que tiene en la actualidad. La alta prevalencia del FVL en población sana sugiere que esta mutación pudiera conferir alguna ventaja selectiva a los portadores. El estado de hipercoagulabilidad asociado al polimorfismo podría proteger a los portadores del alelo en circunstancias de riesgo hemorrágico como veremos más adelante.

La principal manifestación clínica de la resistencia a la PCa es la trombosis venosa profunda, y secundariamente, el embolismo pulmonar. Estudios familiares calculan que la incidencia anual de tromboembolismo es cercano al 0,18% para aquellos individuos con genotipo normal, 0,37% para heterocigotos y 1,0% para homocigotos de FVL. Mediante el diseño de estudios caso/control, se ha calculado que el riesgo de trombosis venosa se incrementa entre 5-10 veces en individuos heterocigotos y hasta 50-100 veces en homocigotos. Aunque entre los homocigotos la penetrancia de los síntomas es elevada, algunos de ellos permanecen asintomáticos toda su vida. Pese al gran número de estudios realizados en pacientes con trombosis arterial, no se ha podido establecer una asociación entre el FVL y enfermedad cardiovascular (25).

Protrombina 20210A/G. En 1996 el grupo de Bertina describió, en familias con clara sospecha de trombofilia hereditaria pero sin causa biológica conocida que lo justificara, una alta incidencia de un nuevo polimorfismo en región no codificante de la protrombina que se comportaba como un nuevo factor de riesgo trombótico. La observación fue confirmada rápidamente, y como veremos a continuación con más detalle, esta nueva variante ha enriquecido el listado de variantes genéticas asociadas riesgo trombótico.

Se han descrito varios polimorfismos en el gen de la protrombina humana de los que cinco (localizados en los residuos -42, 13, 31, 274, y 389) son sustituciones silenciosas, sin efecto en la secuencia aminoacídica de la proteína madura. Poort y colaboradores seleccionaron 28 pacientes con historia familiar de trombofilia, secuenciaron todos los exones, incluidas las zonas de regulación del procesamiento exón-intrón y las regiones 5' y 3' no codificantes del gen de la protrombina, y observaron que en el 18% de los enfermos existía un cambio heterocigoto (G por A) en la posición 20210, el último nucleótido del extremo 3' no codificante. Esa misma variación solamente se presentaba en el 1% de los individuos sanos (24).

Diferentes grupos han confirmado que el alelo 20210A se encuentra en un rango de 4-8% de pacientes con un primer episodio de trombosis venosa y en el 1-2% de individuos sanos (4,27). El riesgo relativo de trombosis venosa asignado a los portadores heterocigotos de la variante de protrombina es de 2-7 veces. Al igual que ocurre con el FVL, la presencia del polimorfismo 20210A de la protrombina se restringe a población caucasiana, sin grandes variaciones geográficas en este caso (27).

En los casos de sujetos homocigotos para este polimorfismo si bien la trombosis suele aparecer en edades más tempranas, en cualquier caso resultan menos severos que las deficiencias homocigotas de AT, PC, PS o FVL. En resumen, los datos publicados indican que el alelo 20210A del gen de la protrombina es un factor de riesgo moderado de diátesis tromboticas venosas. Por el contrario, no los hay de que este polimorfismo sea un factor de riesgo asociado a trombosis arterial (28).

No se conoce con exactitud el mecanismo último mediante el cual el alelo 20210A pueda contribuir al desarrollo de una trombosis. La presencia de este alelo se asocia significativamente con niveles más elevados de FII en plasma, lo que también se ha relacionado con el riesgo de trombosis venosa. Queda por aclarar si el cambio G por A en la posición 20210 del gen de la protrombina es el responsable directo del incremento de proteína en el plasma, o si bien esta mutación se asocia con otra variación en la secuencia que module el control de la transcripción o traducción del gen del FII.

Variabilidad fenotípica en trombofilia. Ejemplo de su carácter multigénico y multifactorial.

Las variaciones genéticas identificadas en pacientes con trombofilia tienen herencia autosómica dominante y se asocian al desarrollo de trombosis venosa (14,15). Sin embargo, las manifestaciones clínicas muestran gran variabilidad tanto en la severidad como en la edad de aparición del primer episodio trombotico (16). En términos generales, las deficiencias de proteínas anticoagulantes AT, PC y PS suponen un riesgo importante de desarrollar episodios tempranos de trombosis venosa. No obstante, existen familias en las que este tipo de deficiencias supone un fuerte factor de riesgo, mientras que en otras, incluso con la misma mutación, el riesgo asociado es muy leve (36). Esta observación pone de manifiesto la participación de diversos factores genéticos y/o ambientales en la determinación del riesgo global del individuo para sufrir un episodio de trombosis. Especialmente, tras el descubrimiento de los polimorfismos protromboticos ya comentados -FV Leiden y protrombina 20210A/G, frecuentes en la población caucasiana, se ha comprobado que la combinación de alguna de las anomalías incrementa de forma significativa el riesgo de sufrir episodios tromboticos, reduce la edad del primer episodio y aumenta el riesgo de recurrencia (29, 30, 31, 35). Así, la coexistencia de FV Leiden y deficiencia de PC aumenta más de 3 veces el riesgo de trombosis venosa, y más de 10 veces cuando se asocia a la deficiencia de PS (15). También la combinación del polimorfismo 20210 A/G de la protrombina duplica el riesgo en sujetos con FV Leiden (9,29). Estos datos, junto a la existencia de un elevado número de familias con trombofilia (más de un 20%) y pacientes no seleccionados con trombosis venosa (más del 60% en nuestra

población) en los que no se ha identificado ningún trastorno genético, hace pensar que deben existir otras alteraciones genéticas que, afectando a diferentes elementos del sistema hemostático, contribuyan al riesgo trombótico. Finalmente, se ha demostrado que diferentes factores ambientales como el embarazo, cirugía, inmovilización o los anticonceptivos orales, también potencian notablemente el riesgo trombótico asociado a alteraciones genéticas (4, 32, 33, 37). Por ejemplo, la toma de anticonceptivos orales multiplica por 10 el riesgo de sufrir trombosis venosa de un heterocigoto para la variante molecular del FV Leiden (34).

Las observaciones indicadas han propiciado un cambio de concepto de la trombofilia venosa, considerándose ya enfermedad multigénica y multifactorial, donde diferentes factores genéticos y ambientales determinan el riesgo específico de cada individuo para sufrir un episodio trombótico.

V. Variabilidad polimórfica del sistema hemostático.

Las estrategias moleculares clásicas han sido útiles para la identificación de mutaciones responsables de enfermedades monogénicas, poco frecuentes y con patrón de herencia mendeliano. Sin embargo, esos procedimientos han tenido una utilidad limitada en la caracterización molecular de enfermedades complejas y mucho más comunes, como la enfermedad cardiovascular, diabetes o enfermedades neurodegenerativas. También hay un componente genético en ellas, pero a diferencia de las enfermedades monogénicas, las variaciones genéticas comunes, los polimorfismos (que tienen aisladamente un efecto funcional pequeño o moderado) van a tener más peso en la susceptibilidad genética para desarrollar estas enfermedades que mutaciones raras (con efecto fisiológico relevante).

El polimorfismo es consecuencia directa de una variación en la secuencia del ADN que se origina por los errores en la replicación y reparación del ADN. Si el cambio se mantiene evolutivamente, y alcanza una prevalencia en la población superior al 1 %, pasa de ser considerado una mutación a ser un polimorfismo. Más del 90 % de los polimorfismos son sustituciones de un nucleótido por otro, por lo que se denominan SNP (“single nucleotide polymorphism”). Los otros polimorfismos son pequeñas inserciones o deleciones de una a varias decenas de nucleótidos. Como venimos señalando, el interés por los SNPs ha sido enorme en los últimos años. Así, el número de SPNs descritos pasa de unos miles hace escasamente cinco años, a los actuales casi 3 millones incluidos en diferentes bases de datos (38). Se considera que puede haber en torno a un polimorfismo cada 1.000 pb, y un número total que se acerca a los 10 millones (38).

La mayoría de los polimorfismos se localizan en regiones poco trascendentes de los genes y no afectan su función o de la proteína que codifica. Esos cambios se denominan silenciosos o neutrales, y son de enorme utilidad en estudios de “rastreo” (scanning) del genoma, pues sirven como excelentes marcadores debido a su abundancia, elevada frecuencia y distribución por todo el genoma. Son muy sencillos de identificar empleando técnicas de “microarray”, que permiten genotipar miles de SNPs en poco tiempo a costes relativamente bajos. Pero en estas páginas nos vamos a referir a los polimorfismos que, localizados en regiones reguladoras o codificantes, afectan los procesos de transcripción, estabilidad del ARN, traducción, procesos postraduccionales, estabilidad, estructura, o función de la proteína. Son los llamados polimorfismos funcionales. Y nos centraremos en aquellos polimorfismos funcionales relacionados especialmente con el sistema hemostático, analizando tres aspectos en los que estos polimorfismos pueden jugar un importante papel: su relación con la enfermedad tromboembólica, su significado evolutivo, y su posible relación con la farmacogenética del sistema hemostático. Pero antes de abordar estos aspectos, consideramos de interés hacer referencia a las herramientas o procedimientos de trabajo con las que estamos consiguiendo estos datos.

Procedimientos metodológicos para establecer la relación de un polimorfismo genético y el riesgo de trombosis.

Hay dos procedimientos o vías para buscar la relación de nuevos polimorfismos y el riesgo trombótico, los denominados estudios de *asociación*, y los análisis de segregación familiar o estudios de *vinculación* (*linkage*). Ambas herramientas tienen sus ventajas e inconvenientes, que recientemente se han revisado con detenimiento (39-44).

Estudios de asociación.- Es la metodología que más se ha empleado para buscar la relación entre un polimorfismo genético y la aparición de trombosis. Se basa en un análisis caso/control, que compara la presencia de variantes genéticas (polimorfismos) en individuos sanos (controles) y enfermos (casos), no emparentados entre ellos. Estos estudios son útiles para analizar polimorfismos conocidos en genes previamente establecidos como candidatos.

Éste tipo de estudios, aunque con algunas limitaciones que más adelante indicaremos, ha sido capaz de proporcionar evidencias relevantes, aunque indirectas, de la relación de una variante genética y el riesgo trombótico, si bien siempre hay que tener presente que una relación de *asociación* no implica necesariamente causalidad. Una exigencia muy importante a todos los estudios

de *asociación* es una buena estratificación de casos y controles, que deben obligadamente reunir una serie de características similares, como misma etnia, edad, sexo, factores ambientales, etc.

Por otra parte, en ocasiones se podría elegir para análisis uno o varios polimorfismos conocidos asumiendo que son funcionales, pero es cierto que en ocasiones no existe evidencia fisiológica o bioquímica suficiente de que el polimorfismo analizado sea funcional. Otro hecho a tener en cuenta en los estudios de *asociación* surge cuando se encuentra una relación positiva. En ese caso, no se puede demostrar con absoluta certeza que el polimorfismo analizado sea realmente el que aumenta el riesgo de padecer la enfermedad, sino que el causante podría ser otro polimorfismo en desequilibrio de ligamiento con él. Por el contrario, una asociación negativa tampoco excluye que el gen estudiado esté implicado en el riesgo a padecer la enfermedad, simplemente indica que el polimorfismo de ese gen que se ha utilizado en el análisis no está suficientemente ligado al que realmente causa el riesgo (39). A pesar de estos problemas y debido a la generalización de las técnicas de PCR en los laboratorios clínicos, la medicina de finales de siglo XX ha vivido una avalancha de estudios de asociación para relacionar polimorfismos en determinados genes candidatos con todo tipo de enfermedades complejas, incluida la enfermedad tromboembólica.

Estudios de vinculación (Linkage).- La base de estos métodos descansa en la genética de rasgos cuantitativos analizados en familias. Son básicamente estudios de ligamiento genético que permiten demostrar la cosegregación dentro de una familia de una enfermedad y las variantes genéticas responsables. Es decir, persiguen establecer relaciones inequívocas de causa-efecto, y también analizar genes candidatos con mayor seguridad que los estudios de *asociación* (39). Esta estrategia permite localizar los sitios cromosómicos (*loci*) que contienen genes que influyen en la variabilidad del fenotipo bajo estudio. Cada uno de estos *loci* se conoce como QTL (*quantitative trait locus*).

Para este tipo de análisis se pueden aplicar diferentes diseños familiares: estudio de gemelos, pares de hermanos o familias extensas, utilizando diferentes técnicas estadísticas para realizar análisis de ligamiento genético (39). Los inconvenientes atribuidos a esta aproximación metodológica radican especialmente en la gran dificultad para encontrar familias suficientemente grandes que puedan ser informativas (40). Al igual que con los estudios de *asociación*, los análisis de *vinculación* no son suficientes para demostrar relación inequívoca causa-efecto, a menos que se realicen estudios funcionales. Finalmente, junto con algún otro inconveniente, los estudios de *vinculación* son más complejos de realizar, siendo necesaria una participación obligada y fiable de genetistas y

estadísticos conocedores de la metodología (40). Muy recientemente ha surgido un interesante debate entre defensores y detractores de ambos métodos de análisis (41-44).

VI. Polimorfismos genéticos y trombosis arterial.

Observando la complejidad del sistema hemostático comprendemos que la descripción de posibles polimorfismos funcionales asociados a proteínas procoagulantes, anticoagulantes, profibrinolíticas, antifibrinolíticas, inflamatorias y receptores adhesivos celulares no haya parado de crecer (4, 30, 31, 45). Para aportar una idea de esta actividad basta con una búsqueda sencilla en el mes de abril, introduciendo las palabras *polymorphism & cardiovascular* en la base de datos bibliográficos “*pubmed*”, se obtienen 1.929 publicaciones, y si se opta por incluir *polymorphism & thrombosis* obtendremos información adicional de 771 trabajos publicados. Estas cifras nos indican la intensidad del trabajo que se está llevando adelante, así como la dificultad real para hacer una evaluación exhaustiva de todos los datos publicados. La tarea de referirnos a todos ellos es un trabajo imposible. Es por ello, que haremos referencia de los que a nuestro juicio pueden ser más demostrativos y relevantes para explicar adecuadamente el estado de la cuestión, y en los que la contribución de nuestro grupo a su estudio ha sido más intensa (25, 28, 50-73). Por otra parte, dada la discrepancia del mecanismo patogénico entre trombosis venosa y arterial (2), y al haber considerado detenidamente ya la trombosis venosa, nos centraremos en la influencia de los polimorfismos genéticos en trombosis arterial.

Polimorfismos genéticos que afectan a los receptores adhesivos plaquetarios y que se han asociado a riesgo trombótico arterial.

Las plaquetas juegan un papel primordial en la generación del episodio trombótico en la patología arterial (46). En la membrana plaquetaria están presentes una serie de receptores de adhesión celular y activación plaquetaria, cuyo normal funcionamiento es clave para que se produzca una buena interacción plaqueta subendotelio, así como para que se establezcan puentes de unión interplaquetarios, y en definitiva para consumir el fenómeno de agregación plaquetaria (47, 107). El complejo glicoproteico Ib/IX/V está especialmente vinculado con el fenómeno de adhesión

plaquetaria al subendotelio vascular a través de su ligando natural, el Factor von Willebrand (105, 106). A su vez, la GPIa/IIa es uno de los receptores del colágeno, por lo que también juega un papel relevante en la adhesión celular. Por el contrario, la GPIIb/IIIa, aunque mantiene una actividad en el mecanismo de adhesión plaquetaria, su principal función es la de la activación celular, fundamental para el fenómeno de la agregación plaquetaria (46,47). La importancia de las dos glicoproteínas queda expresada por las manifestaciones importantes de sangrado que presentan las personas con anomalías cuantitativas o cualitativas de alguna de ellas (48, 49).

Nuestro grupo investigó la relación de diferentes polimorfismos funcionales que afectan a esas glicoproteínas y su asociación con riesgo de enfermedad tromboembólica arterial (53, 56, 57, 62, 71). En primer lugar elegimos el estudio de dos polimorfismos ligados de la GPIb α (53). Concretamente se estudió un polimorfismo de tamaño, ya que en el gen de la GPIb α existen cuatro posibilidades de secuencia dependiendo de la repetición de una secuencia de nucleótidos (región VNTR, *variable number of tandem repeats*). Cada repetición ocasiona una elongación del receptor por repetición de 13 aminoácidos, localizados en la región aminoterminal de la glicoproteína. Se planteó que la variante molecular que condiciona un receptor con mayor longitud (3 ó 4 repeticiones) podría tener una mayor capacidad de acceder a su ligando que el receptor más corto (1 ó 2 repeticiones), lo que podría estar asociado a un mayor posibilidad de adhesión plaquetaria y en definitiva un incremento de riesgo trombótico.

Por otra parte, comprobamos como el gen de la GPIa presenta dos variantes genéticas de gran interés (56, 57), el cambio nucleotídico 807C/T que ocasiona un cambio del aminoácido Glu505Lys, responsable del sistema aloantigénico plaquetario HPA-5, pero que principalmente induce a un aumento muy notable en la densidad del receptor en superficie plaquetaria (57). En estudios de adhesión *in vitro* el polimorfismo da lugar a un claro aumento de adhesión plaquetaria a superficies revestidas de colágeno (74). Por motivos obvios, era de gran interés indagar el papel de ese polimorfismo en la definición de riesgo trombótico.

La GPIIb/IIIa es un complejo clave en el proceso de activación y agregación plaquetaria. La existencia de un polimorfismo en su región caliente de unión con sus ligandos plasmáticos – fibrinógeno, FvW, fibronectina y vitronectina-, que condiciona el cambio Leu33Pro y determina el sistema aloantigénico plasmático HPA-1, hacía muy atractivo su estudio. El interés era aún mayor al

haber sido sugerido por Weiss el posible papel relevante del polimorfismo en su asociación con infarto de miocardio (75).

Nuestros estudios encontraron una clara asociación de los polimorfismos que condicionan un mayor tamaño de la GPIIb/IIIa con riesgo arterial, sin embargo esa asociación no pudo ser demostrada con los otros polimorfismos de las glicoproteínas estudiadas (53, 56, 57, 62, 71). Analizando lo publicado nos encontramos con una intensa controversia referente al verdadero papel que juegan éstos y otros polimorfismos plaquetarios en el riesgo trombótico (31,54) y, como veremos más adelante, intentaremos explicar los motivos por los que a nuestro juicio no se han conseguido datos más claros y evidentes.

Polimorfismos genéticos que afectan a proteínas del sistema de coagulación y se han asociado a riesgo trombótico arterial.

Al igual que hemos hecho en el apartado anterior, haremos referencia específica en estas líneas a algunos de los polimorfismos genéticos investigados por nuestro grupo, si bien se han estudiado variaciones genéticas de un amplio número de genes que participan de alguna forma en el sistema de la coagulación sanguínea. La elección de los polimorfismos estuvo más que justificada ante la sospecha de que las variaciones que podían generar, podrían intervenir modulando el riesgo de aparición del fenómeno trombótico arterial, ya al ocasionar variaciones notables de la proteína circulante del sistema de coagulación, o bien por modificar la intensidad de la función que tienen encomendada.

Los clásicos estudios epidemiológicos de riesgo de enfermedad arterial relacionaban altos niveles plasmáticos de FVII y fibrinógeno con la mayor probabilidad de sufrir un infarto de miocardio (76). Hace unos años tuvimos la oportunidad de confirmar que la inserción de 10 nucleótidos en posición -323, en la región promotora del gen que codifica el FVII, se asocia con una significativa reducción en los niveles circulantes de este importante elemento procoagulante. (51). En 1998 un grupo italiano indicó que los individuos cuya variedad genotípica condiciona niveles menos elevados de FVII tenían un menor riesgo de sufrir infarto de miocardio (77). A esta atractiva idea le siguieron un número importante de investigaciones, y en la mayoría de ellas no se pudo constatar esa asociación (31, 52, 55, 78)

También se ha podido demostrar que un polimorfismo común (C46T) en la región Kozak del FXII regula los niveles plasmáticos de la proteína (79). Muy recientemente están surgiendo datos, que como venimos repitiendo, no dejan de ser contradictorios en cuanto al verdadero riesgo trombótico que supone la presencia de este polimorfismo (80, 81).

Se ha identificado una variante genética frecuente en el gen que codifica al FXIII, pudiendo ocasionar la presencia de una Val/Leu en posición 34 (61). El FXIII tiene como función en el sistema hemostático la de estabilizar la fibrina generada tras la activación del sistema de la coagulación sanguínea. El cambio, localizado a solo 3 aminoácidos delante del sitio de activación por trombina, afecta significativamente a dicho proceso. De hecho, la variante Leu34 es más eficientemente activada por trombina, se asocia con mayor nivel de actividad transglutaminasa, y genera unos coágulos de fibrina estructuralmente diferentes y más densos que la variante Val34 (82). Clínicamente, estudios realizados en poblaciones del norte de Europa sugieren que el alelo Leu34 pudiera jugar un papel protector trombótico tanto en territorio arterial como venoso, aunque no explican la aparente contradicción entre el fenotipo bioquímico y clínico (30, 31). En nuestro medio, al igual que en otros, no hemos sido capaces de confirmar el mayor riesgo de trombosis arterial que se le ha conferido a la variante Val34 (61, 64, 72).

Polimorfismos genéticos que afectan a proteínas no pertenecientes al sistema hemostático pero que se han asociado a riesgo trombótico arterial.

También han sido descritas numerosas variaciones genéticas de proteínas que si bien no participan directamente en los sistemas de coagulación, fibrinólisis o interacción endotelio-plaquetaria, si lo pueden hacer indirectamente e intervenir en el riesgo trombótico (30, 31). Nuevamente haremos referencia en este apartado a los resultados conseguidos por nuestro grupo, con el ánimo de ilustrar un área de notable interés (66, 68, 73).

En la última década a la interacción neutrófilo-plaqueta se le ha asignado un notable valor. El sistema de la selectina P se tiene una especial importancia en la explicación de esta relación. El ligando de la glicoproteína selectina P (PSGL-1), al igual que hemos indicado para la GPIb α , presenta un polimorfismo de tamaño (VNTR) con repeticiones de 14, 15 ó 16 veces (alelos A, B o C). Tras demostrar que las formas más largas tienen una ventaja para favorecer la interacción plaquetas-neutrófilos, comprobamos que los individuos con esas variantes pueden presentar un factor de riesgo más elevado de enfermedad cerebrovascular y coronaria (66).

También llamó nuestra atención el estudio de las variantes genéticas de la Anexina V. Esta proteína, una vez liberada al plasma de la pared vascular, se une a fosfolípidos de membrana cargados negativamente, lo que ocasiona que en la superficie plaquetaria se dificulte la activación del sistema de coagulación, e incluso inhiba la adhesión y agregación plaquetaria (83). Nuestro estudio mostró que los niveles plasmáticos se relacionan con una variante genética común en la región Kozak (-1C>T). La presencia del polimorfismo que condiciona niveles aumentados de Anexina V reducía el riesgo de desarrollar un infarto de miocardio en individuos jóvenes, con edad inferior a los 45 años. Estos datos no son coincidentes entre diferentes grupos (68, 73, 84).

Como indicamos al inicio del apartado, además de los polimorfismos comentados se han investigado un amplio número de polimorfismos de genes responsables de la codificación de proteínas relacionadas directa o indirectamente con el riesgo trombótico arterial. Pese a la cantidad de estudios realizados, no se ha alcanzado un claro consenso para definir el riesgo preciso que ocasiona la presencia de una variante molecular concreta.

¿Nos aporta información el estudio de los polimorfismos genéticos para definir el riesgo trombótico arterial?

Como hemos podido ver, el esfuerzo y las expectativas depositadas en la aportación de los polimorfismos genéticos en relación con la definición de riesgo de enfermedad trombótica arterial ha sido y sigue siendo muy importante. Sin embargo, un análisis riguroso de los resultados conseguidos no es a primera vista muy alentador, ya que muestra discrepancias frecuentes entre los resultados conseguidos por diferentes grupos, incluso de un mismo país, donde las diferencias étnicas y ambientales de la población estudiada deben ser menos manifiestas.

Hay varios motivos que pueden explicar esta situación. Unos están relacionados con la selección y estratificación adecuada de la población estudiada, otros con la cada vez más evidente interacción génica (gen-gen) y genes con factores ambientales, “diálogos” que pueden ejercer un efecto sinérgico o antagónico. Pese a todo, y a nuestro entender, el conocimiento que hoy tenemos con sus amplias limitaciones, no se habría generado sin la fase previa de estudio de las variantes genéticas frecuentes en la población, y pensamos que abre una extraordinaria puerta y un nuevo enfoque al estudio de la enfermedad trombótica arterial como enfermedad multigénica y multifactorial. Algunas de las discrepancias que podrían justificar las diferencias entre los resultados conseguidos, serían las siguientes:

En primer lugar hay que ser conscientes de que la mayoría de estudios realizados han sido de “asociación”, y la comparación entre ellos hace aflorar las clásicas críticas que hacen sus detractores (39):

- Un número importante de estudios muestran un número inadecuado de enfermos y controles.
- La edad, sexo y pertenencia homogénea a una determinada etnia son exigencias básicas que a veces no aparecen en la información aportada por las distintas publicaciones, especialmente las realizadas en países donde existe una importante mezcla de razas.
- La comparación de resultados entre casos y controles demanda una gran disciplina en igualar las dos series, no solamente con los criterios básicos ya comentados, edad, sexo y etnia, sino también considerando la presencia de factores ambientales concomitantes, como la existencia de diabetes, hipertensión, hábito tabáquico y también hay que tener muy presente el hecho de que sean enfermos seleccionados o pacientes consecutivos, etc.
- Muchos estudios muestran diferencias esenciales en el fenotipo clínico elegido para la inclusión de pacientes (“end point”). No es lo mismo seleccionar pacientes con enfermedad isquémica coronaria, infarto de miocardio, angina inestable, supervivientes de un evento trombótico, que autopsias de pacientes fallecidos, etc. Desgraciadamente estos errores pueden hacer difícil analizar la verdadera importancia de los resultados.
- También hay que ser consciente de la posibilidad de un sesgo de la propia publicación, ya que resultados positivos, incluso obtenidos con pocos pacientes, se aceptan más fácilmente que los negativos conseguidos con muestras mayores.

La segunda consideración está relacionada con la falta de análisis de interacción génica, situación que ha empezado a ser valorada muy recientemente con gran interés. De hecho, se ha comprobado en una población homogénea de una pequeña isla canadiense, una interacción muy llamativa entre el polimorfismo 20210A/G de la protrombina y el del FXIII Val34Leu para modificar el riesgo de infarto de miocardio (85). Nuestro grupo también demostró que la coexistencia de dos polimorfismos vecinos en el gen la protrombina -A19911G y G20210A- también es capaz de modificar el riesgo trombótico (70). Igualmente se ha definido una situación similar para un haplotipo funcional en el gen del FVII (86).

En tercer lugar debemos considerar la posibilidad de un comportamiento distinto de un determinado genotipo ante un factor ambiental determinado. Esa influencia ya se describió en

mujeres portadoras de FV Leiden, que cuando tomaban anticonceptivos orales incrementaban drásticamente su riesgo de padecer una trombosis venosa profunda. Recientes publicaciones indican que la hipercolesterolemia ejerce una acción sinérgica con el polimorfismo del FXII C46T aumentando el riesgo de infarto de miocardio en personas jóvenes (81). El fumar duplica el riesgo de infarto de miocardio con determinados polimorfismos del FVII (87). Las hormonas femeninas pueden modificar el nivel de proteínas plasmáticas, como la homocisteína, asociadas a riesgo trombótico (88), etc. Indudablemente, estas son algunas observaciones preliminares que despiertan interés al aumentar la evidencia de la estrecha interacción que debe existir entre genes y medio ambiente.

En un intento de soslayar algunos de los inconvenientes comentados, se han realizado diferentes meta-análisis y revisiones con el objetivo de evaluar de forma global la información disponible, buscando alcanzar una mayor fuerza estadística por el número de pacientes y controles que incluyen. Los resultados de estos estudios sugieren que incluso para los polimorfismos en los que se observa un efecto estadísticamente significativo, el riesgo trombótico asociado (OR) es muy débil y apenas alcanza el valor de 1,2 (45). Con la experiencia acumulada durante años en este campo, nuestra opinión es que la posibilidad de que un polimorfismo aislado precipite la aparición de un evento trombótico arterial es muy bajo. Sin embargo, la asociación de varios polimorfismos con fenotipos hemostáticos, pueden tener un mayor peso trombótico.

Pondremos un ejemplo que nos ayude a entender la complejidad de la situación. Desde hace años se conocía que el aumento de los niveles plasmáticos de fibrinógeno (fenotipo hemostático), se asociaba con elevado riesgo de sufrir trastornos trombóticos arteriales (fenotipo clínico) (76). Hace unos años se demostró que el polimorfismo -455G/A del fibrinógeno condiciona mayores niveles plasmáticos de la proteína (89). Con esa observación era esperable que se postulara a ese polimorfismo como candidato a incrementar significativamente el riesgo de trombosis arterial. Sin embargo, en 22 estudios independientes mostraron que el riesgo trombótico asociado al polimorfismo es bajo, OR menor de 2 (45, 31). A nuestro juicio, la explicación a esta aparente paradoja se encuentra en la tendencia que tenemos a simplificar los fenotipos complejos, y el nivel de fibrinógeno plasmático debe ser considerado como un fenotipo complejo.

Como en cualquier fenotipo complejo, la variante molecular puede jugar un papel en la variabilidad de los niveles plasmáticos de la proteína. Sin embargo, no es lógico que toda la variabilidad interindividual esté exclusivamente determinada por un único polimorfismo localizado

en el gen estructural. Es muy factible plantear que en ese mismo gen pueden existir diferentes polimorfismos que ejerzan diferentes efectos sobre los niveles de la proteína. Pero además, polimorfismos en genes reguladores y en otros genes, también pueden influir sobre el fenotipo clínico. Y por supuesto, todos estos efectos pueden variar, y de hecho lo hacen, en función de los factores ambientales a los que se vea sometido el individuo (dieta, fármacos, etc.). Por todo ello, y en términos generales, el efecto de un polimorfismo aislado sobre la expresión de un fenotipo hemostático será débil. Sólo la tipificación y caracterización de perfiles complejos de múltiples polimorfismos con capacidad de interaccionar entre ellos permitirá conocer mucho más exactamente la base genética de la variabilidad interindividual a la hora de manifestar un fenotipo clínico, que en este caso será el de riesgo trombotico arterial.

Con lo que acabamos de indicar, para establecer la base genética del riesgo trombotico arterial, deberíamos considerar el efecto de la variabilidad polimórfica en su conjunto, sin limitarnos al estudio de una única variedad genética y profundizar en su relación sinérgica o protectora interaccionando con un amplio abanico de posibilidades ambientales. Con esa estrategia muy posiblemente podremos identificar genotipos específicos que definan un alto riesgo predictivo de trombosis. En este sentido, el enorme desarrollo tecnológico en el campo de la genética molecular nos permite aventurar que en pocos años dispondremos de métodos diagnósticos, “microarrays”, que sean operativos (reproducibles, sencillos y con bajo coste) para la identificación de perfiles genéticos protromboticos. En los últimos meses han comenzado a surgir los primeros datos, pero al igual que sucede en oncología molecular, tendremos que esperar un tiempo prudencial para obtener conclusiones y respuestas sólidas.

VII. Significado evolutivo de los polimorfismos genéticos del sistema hemostático. ¿Nos aportan los polimorfismos protromboticos algún beneficio?

Manteniendo la línea argumental del apartado anterior, algunos de los polimorfismos hemostáticos, de forma individual, sólo tienen un efecto suave para incrementar el riesgo a sufrir episodios tromboticos arteriales, a diferencia de las variantes genéticas del FV Leiden y el de la protrombina 20210A que tienen un poder más significativo en la definición de riesgo de trombosis venosa.

Al aceptar la asociación de un polimorfismo genético que ocasiona un incremento del riesgo trombótico, surge la necesidad de explicar por qué una mutación deletérea potencialmente dañina como el FV Leiden, llega a estar presente actualmente en más de 50 millones de caucásicos (4 % de la población española y 12 % en la población del norte de Europa). Una posibilidad, válida en muchos casos, es que estos cambios sean casi neutrales y que apenas tengan efecto en la hemostasia, entre otras razones, por la existencia de redundancias (diferentes proteínas que realizan funciones similares). Alternativamente una presión evolutiva podría inducir y seleccionar cambios genéticos buscando aportar alguna ventaja funcional o vital. Pero ¿qué ventajas evolutivas pueden aportar los polimorfismos protrombóticos?

En nuestro medio los problemas hemorrágicos están muy lejos de generar una morbimortalidad que se avecine a la de los episodios trombóticos arteriales. Si, por el contrario, nos encontrásemos con un mayor riesgo hemorrágico que trombótico, cualquier cambio genético con finalidad protrombótica que ocurriese podría ser considerado como una variación con finalidad protectora. Las características de la sociedad hace 30.000 años, cuando se estima que surgen el FV Leiden y la protrombina 20210A, eran muy diferentes a las que experimenta la sociedad occidental reciente. Antes, la expectativa de vida era muy baja (menos de 45 años, lo que favorecía aún más que el riesgo trombótico fuese pequeño). Las condiciones higiénicas, sanitarias y nutritivas, hacían del menor trastorno hemorrágico (frecuentes por el tipo de vida rural y bélico) un riesgo vital. En aquellas condiciones cualquier cambio protrombótico moderado aportaría más beneficios que problemas, y podría ser seleccionado (durante más de 20.000 años) para alcanzar la frecuencia actual.

Varios estudios recientes sugieren que el supuesto efecto protector de los polimorfismos protrombóticos en situaciones de sangrado pudiera seguir siendo beneficioso en nuestros días. El grupo de Dahlback sugiere que el FV Leiden reduce la pérdida de sangre durante el parto y menstruación (90, 91). Se ha estimado que la combinación de anemia con hemorragias obstétricas pudiera ser causa de más de la mitad de las muertes de mujeres a lo largo de la historia. Por ello, la aparición de un cambio genético como el FV Leiden, que ocasiona un estado protrombótico moderado, podría elevar las posibilidades de supervivencia de su portadora. No es difícil especular que si este efecto fuese más importante en las mujeres fértiles, podría asociarse a una rápida expansión del cambio genético en la población. De hecho, se ha señalado que el FV Leiden pudiera jugar un papel beneficioso en el implante placentario del embrión, ya que parece ser más eficiente en las portadoras del polimorfismo (95). Nuestro grupo también ha identificado un papel protector de los

dos polimorfismos -FV Leiden y protrombina 20210A- para la hemorragia cerebral (65), datos que han sido confirmados (92). Además, otras investigaciones sugieren que el FV Leiden y la protrombina 20210A también podrían proteger del sangrado en hemofílicos (93, 94).

Finalmente, la diferencia en la prevalencia de las variantes genéticas en diferentes poblaciones, es otro dato más que sugiere la existencia de una fuerza de selección que modula los cambios genéticos. La intensidad de un supuesto efecto protector de un polimorfismo concreto depende de las características genéticas y ambientales de cada población. Por tanto, la presión evolutiva puede ser diferente en cada población y las diferencias quedan reflejadas como variaciones significativas en la frecuencia de la variante genética.

VIII. Farmacogenética y sistema hemostático

El conocimiento de la variabilidad genética de las proteínas implicadas en mantener el equilibrio hemostático trae de la mano, además de los aspectos concretos comentados en páginas anteriores, la posibilidad de entender la gran variabilidad de respuesta interindividual a la administración de fármacos antitrombóticos.

La farmacogenética es la disciplina que estudia la influencia genética en la respuesta farmacológica (96) y conlleva la posibilidad de actuar para prevenir los efectos adversos a drogas, así como la posibilidad de realizar una elección apropiada del tratamiento más eficaz para cada paciente. Se vislumbra que los perfiles de eficacia y toxicidad de una terapia podrían ser sustancialmente mejorados si se tuvieran en cuenta las variaciones genéticas que pueden influenciarlos. Este joven e interesante campo va demostrando cómo polimorfismos localizados en genes que codifican enzimas de la ruta de metabolización del fármaco, transportadores de la droga, y/o las dianas de los propios fármacos pueden condicionar la respuesta terapéutica (97, 98).

En el área de la enfermedad tromboembólica se está consiguiendo información útil, que en un futuro podría condicionar las elecciones terapéuticas individuales. Veamos algunos ejemplos característicos.

La variante genética del enzima metil-tetrahydro-folato-reductasa (MTHFR) C677T modula los niveles plasmáticos de homocisteína, cuyo nivel elevado es para algunos un factor de riesgo trombótico (88). Las terapias que intentan reducir los niveles de homocisteína mediante suplemento

de ácido fólico, para prevenir entre otros objetivos el riesgo de enfermedad cardiovascular, son mucho más eficaces en sujetos con genotipo homocigoto T/T que en C/T o C/C (99).

La terapia anticoagulante oral –antivitaminas K- está ampliamente extendida. En España hay más de 500.000 pacientes (>1% de la población) en tratamiento y prevención de la enfermedad tromboembólica con estos fármacos. Es bien conocida la disparidad de respuesta terapéutica al acenocumarol y warfarina entre individuos, situación habitualmente atribuida a la toma de otros fármacos, o a una alimentación rica en vitamina K. Recientemente se ha demostrado que determinados polimorfismos del citocromo P450 modulan el efecto de la terapia anticoagulante oral, especialmente de la warfarina (100). Pacientes homocigotos a la variante genética CYP2C9*3, y heterocigotos del polimorfismo CYP2C9*1/*3 metabolizan la warfarina más lentamente que los homocigotos CYP2C9*1. Los datos justifican que pacientes con los genotipos indicados requieran menor dosis de anticoagulante, y explicarían el mayor riesgo de complicaciones hemorrágicas observadas en los casos al mantener una dosis estándar (100).

De igual forma, nuestro grupo ha aportado interesantes datos referentes a las variaciones de niveles de anticoagulación que aparecen en enfermos tratados con anticoagulantes orales, dependiendo de si son portadores de determinados polimorfismos que condicionan los niveles circulantes de algunos de los factores vitamina K dependientes, como la protrombina o el FVII (101). Otro ejemplo viene de la terapia antiagregante plaquetaria. Aunque existe una fuerte controversia sobre el efecto del polimorfismo Leu33Pro de la GPIIIa plaquetaria sobre el riesgo trombótico, algunos estudios sugieren la importancia que el cambio genético podría tener en la eficacia del tratamiento con diferentes drogas antiagregantes. Por ejemplo, se ha indicado que dependiendo de la presencia de una variante alélica determinada existirá una tendencia manifiesta a ser resistentes a la acción antitrombótica de la aspirina (102); que exista una menor eficacia antiagregante de los anticuerpos monoclonales contra la GPIIb/IIIa (abciximab), de gran uso en el intervencionismo coronario; o tendencia a modificar el efecto de las estatinas en relación con la aparición de cuadros reoclusivos tras implante de un stent coronario (103, 104).

Acabaremos este apartado haciendo referencia a una notable contribución de nuestro grupo relacionada con la efectividad de la terapia fibrinolítica. La trombolisis es un tratamiento de elección en la fase precoz del infarto agudo de miocardio. Sin embargo, es conocido que la mitad de los pacientes tratados no alcanzan una óptima perfusión o recanalización coronaria. El motivo de esta situación no está aclarado. En un estudio piloto sugerimos que la efectividad terapéutica de la

fibrinólisis puede guardar relación con las características de la fibrina del trombo, hecho muy vinculado a la presencia del polimorfismo del FXIII Val34Leu (69). Un trabajo que hemos dirigido de carácter multicéntrico, que incluye más de 300 pacientes a los que se les ha realizado tratamiento trombolítico en la fase precoz del infarto agudo de miocardio, confirma los resultados preliminares ya comunicados.

En definitiva, algunos pueden tener la visión, un poco pobre, de que a excepción de los polimorfismos de la protrombina 20210A/G y FV Leiden que definen un riesgo aceptado para la aparición de un episodio tromboembólico venoso, poco más se ha conseguido en el campo de la trombosis arterial. Sin embargo, un análisis detenido y riguroso nos muestra una imagen mucho más optimista y esperanzada. Los ejemplos comentados son expresivos y muestran el avance que se está consiguiendo gracias a la identificación y caracterización de las variantes genéticas, así como en la interpretación del “diálogo” continuo “gen-gen” y “gen-factores ambientales”, que aportarán un decisivo impulso para conocer con detalle los elementos que regulan el complejo sistema hemostático.

Por otra parte, el advenimiento de la farmacogenética a un campo con tanta repercusión social como es la enfermedad cardiovascular y venosa, nos anuncia la generación de conocimiento que incidirá de forma relevante en las medidas profilácticas y terapéuticas de la oclusión vascular (108).

IX. Bibliografía

1. R.W. Colman, A. W. Clowes, J.N. George, J. Hirsh, V. Marder. Overview of Hemostasis. En: Hemostasis and Trombosis. Basic principles & Clinical practice. Eds. R.W. Colaman, J. Hirsh, V.J. Marder, A.W. Clones, J.N. Georges. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 3-16, 2000.
2. K.G. Mann. Thrombin formation. Chest. 124 (Supl.1): 4-10, 2003.
3. V. Vicente, M.L. Lozano, J. Rivera, R. González-Conejero, C. Martínez, J. Corral. Bases moleculares de las diátesis hemorrágicas congénitas y estados de trombofilia primaria. En: Patología Molecular. Eds. J.M. González de Buitrago & J.M. Medina Jiménez. McGraw-Hill/Interamericana, Madrid, 193-216, 2001.
4. U. Seligsohn, A. Lubetsky. Genetic susceptibility to venous trombosis. N. Engl. J. Med 344:1222.1231, 2001.
5. A.R. Folsom. Hemostatic risk factors for atherothrombotic disease: an epidemiological view. Thromb. Haemost. 86:366-363, 2001.

6. M.M. Samara, O.E. Dahl, D.J. Quinlan, P. Mismetti, N. Rosencher. Quantification of risk factors for venous thromboembolism: a preliminary study for the development of a risk assessment tool. *Haematologica* 88:1410-1421, 2003.
7. P.M. Mannucci, L. Poller. Venous Thrombosis and anticoagulant therapy. Historical Review. *Br. J. Haematol.* 114:258-270, 2001.
8. R.F. Stevens. The history of Hemophilia in the royal families of Europe. *Br. J. Haematol.* 105:25-32, 1999.
9. J. Aznar, A. Vayá, A. Estellés, Y. Mira, R. Seguí, P. Villa, F. Ferrando, C. Falcó, D. Corella, F. España. Risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A variant and factor V Leiden and their interaction with oral contraceptives. *Haematologica.* 85:1271-1276, 2000.
10. C.J. Murria, A.D. López. Mortality by cause for eight regions of the world: Global burden of disease study. *Lancet* 349:1269-1276, 1997.
11. I. Zuazu-Jausoro, V. Vicente. Hipercoagulabilidad. Manifestaciones clínicas de la enfermedad tromboembólica. En: *Patología General. Semiología Clínica y Fisiopatología.* 2ª Edición. Eds. J. García-Conde, J. Merino, J. González Macías. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, 735-744, 2004.
12. F.R. Rosendaal. Trombosis in the young: epidemiology and risk factors: a focus on venous thrombosis. *Thromb. Haemost* 78:1-6, 1997.
13. M.L. Lozano, V. Vicente. Uso de los antiagregantes plaquetarios. En: *Manual de Terapéutica Médica.* Eds J. Rodés, X. Carné y A. Trilla. Masson, Barcelona, 885-896, 2002.
14. O. Egeberg. Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 13:516-520, 1965.
15. V. Vicente, M.L. Lozano, J. Rivera. Estados de hipercoagulabilidad. En: *Tromboembolismo venoso.* Ed E. Rocha. Editorial Médica Panamericana. Madrid. *Clínicas Médicas de España* 3:27-52, 1996.
16. M. D. Taberner, J.F. Tomás, I. Alberca, A. Orfao, A. López Borrascas, V. Vicente. Incidence and clinical characteristic of hereditary thrombophilia. *Am. J. Hematol.* 36:459-462, 1991.
17. J. Corral. Cambios conformacionales en la antitrombina: relación con la función y patología. En: *Antitrombina: Aspectos básicos, clínicos y terapéuticos* Eds. J. Corral, E. Rocha. Acción Médica, S.A. Médica, Madrid, 13-26, 2003.
18. G. Romeo, H. J. Hassan, S. Staempfli, L. Roncuzzi, L. Cianetti, A. Leonardi, V. Vicente, P. M. Mannucci, R. Bertina, C. Peschle, R. Cortese. Hereditary Thrombophilia: Identification of non sense and missense mutations in the protein C gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 84: 2829-2832, 1987.
19. R. González, I. Alberca, N. Sala, V. Vicente.- Congenital deficiency of protein C. Response to Danazol and DDAVP. *Thromb. Haemost.* 53:320-322, 1985.
20. V. Vicente, I. Alberca, M. D. Taberner, A. López Borrascas.- Ulcer necrotic legs as first manifestation of protein S deficiency. *Blut.* 54:253-254, 1987.

21. V. Vicente, I. Alberca, M. Martin, A. López Borrasca.- Mode of inheritance of type II protein S deficiency. *Blood*. 68:1415, 1986
22. B. Dahlback, M. Carlsson, P.J. Svensson. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:1004-1008, 1993.
23. R.M. Bertina, B.P. Koeleman, T. Koster. Mutation in Blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369:64-67, 1994.
24. S.R. Poort, F.R. Rosendaal, P. Reitsma, R.M. Bertina. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88:3698-3703, 1996.
25. J.A. Iniesta, J. Corral, R. González, J. Fernández, V. Vicente. Ischemic cerebrovascular disease in patients with mutation in the gene coding for coagulation Factor V (Factor V Leiden): a prospective study. *Haemostasis*. 27:105-111, 1997.
26. J. Corral, J.A. Iniesta, R. González-Conejero, V. Vicente. Detection of Factor V Leiden from a drop of Blood by PCR-SSCP. *Thromb. Haemost.* 76:735-737, 1996.
27. V. Vicente, R. González-Conejero, J. Rivera, J. Corral. The prothrombin gene variant 20210A in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica*. 84:356-362, 1999.
28. J. Corral, R. González-Conejero, M.L. Lozano, J. Rivera, I. Heras, V. Vicente. The venous Thrombosis risk factor 20210A allele of the prothrombin gene is not a major risk factor for arterial thrombotic disease. *Br. J. Haematol.* 99:304-307, 1997.
29. J. Corral, I. Zuazu, J. Rivera, R. González-Conejero, F. Ferrer, V. Vicente. Clinical and analytical relevance of the combination of prothrombin 20210 A/A and factor V Leiden: results from a large family. *Br. J. Haematol.* 105:560-563, 1999.
30. R.M. Bertina. Genetic approach to thrombophilia. *Thromb Haemost.* 86:92-103, 2001.
31. D.A. Lane, P.J. Grant. Role of hemostatic polymorphisms in venous and arterial thrombosis. *Blood*. 95: 1517-1532, 2000.
32. V. Vicente, C. Rodríguez, I. Soto, M. Fernández, J.M. Moraleda. Risk of thrombosis during pregnancy and post-partum in hereditary thrombophilia. *Am. J. Hematol.* 46:151-152, 1994.
33. I. Martinelli, E. Sacchi, G. Landi, E. Taioli, F. Duca, P.M. Mannucci. High risk of cerebral vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N. Engl. J. Med.* 338:1793-1797, 1998.
34. F.R. Rosendaal, A van Hylckama, B.C. Tanis, M. Helmerhorst. Estrogen, progestogen and thrombosis. *J. Thromb. Hemost.* 1:1371-1380, 2003.
35. I. Tirado, J. Mateo, J.M. Soria, A. Oliver, M. Borrell, I. Coll, C. Vallvé, J.C. Souto, E. Martínez, J. Fontcuberta. Contribution of prothrombin 20210A allele and Factor V Leiden mutation to thrombosis risk in thrombophilic families with other hemostatic deficiencies. *Haematologica*. 86:1200-1208, 2001.

36. M. Margaglione, V. Brancaccio, A. Ciampa, M.L. Papa, E. Grandote, G. di Minno. Inherited thrombophilic risk factors in a large cohort of individuals referred to Italian thrombophilia centres: distinct roles in different clinical setting. *Haematologica*. 86:634-639, 2001.
37. A. Van Hylckama, F.R. Rosendaal. Interaction between oral contraceptives use and coagulation factor levels in deep venous thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 1:2186-2190, 2003.
38. L. R. Cardon, L.J. Palmer. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet*. 361:598-604, 2003.
39. J.C. Souto. Genetic studies in complex disease: the case prolinkage studies. *J. Thromb. Haemost.* 1:1676-1678, 2003.
40. F.R. Rosendaal. Genetic studies in complex disease: the case proassociation studies. *J. Thromb. Haemost.* 1:1679-1680, 2003.
41. F.R. Rosendaal, P.H. Reitsma. Genetic studies in complex disease. *J. Thromb. Haemost.* 2:342, 2004.
42. L. Mollica, D.A. Lane. Genetic studies in complex disease. *J. Thromb. Haemost.* 2:342-343, 2004.
43. M. Margaglione. Genetic studies in complex disease. *J. Thromb. Haemost.* 2:343-344, 2004.
44. P. Merlini, D. Ardissino. Genetic studies in complex disease. *J. Thromb. Haemost.* 2:344-345, 2004.
45. J. Corral, R. González-Conejero, V. Vicente. Variabilidad polimórfica en el sistema hemostático: Efecto en trombosis, hemorragia y farmacogenética. *Haematologica (Sup.1)* 87:307-312, 2002.
46. J. Ware, Z.M. Ruggeri. Platelet adhesion receptors and their participation in hemostasis and thrombosis. *Drugs Today* 37:265-274, 2001.
47. Z.M. Ruggeri. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J. Thromb. Haemost.* 7:1335-1340, 2003.
48. L. de Marco, M. Mazzucato, F. Fabris, D. Roia, P. Coser, A. Girolami, V. Vicente, Z.M. Ruggeri. Variant Bernard-Soulier syndrome type Bolzano: a congenital bleeding disorder due to a structural and functional abnormality of the platelet glycoprotein Ib-IX receptor. *J. Clin. Invest.* 86:25-31, 1990.
49. E.G. Arias-Salgado, J. Tao, C. González-Manchón, N. Butta, V. Vicente, M.S. Ayuso, R. Parrilla. Nonsense mutation in exon-19 of GPIIb associated with thromboastenic phenotype. Failure of GPIIb (597-1008) to associate with GPIIIa. *Thromb. Haemost.* 87:684-691, 2002.
50. J. Corral, R. González-Conejero, J.A. Iniesta, J. Rivera, M.L. Lozano, V. Vicente. HPA-1 genotype in ischemic cerebrovascular disease. Role of HPA-1b polymorphism in platelet function. *Blood Coag. Fibrinol.* 8:284-290, 1997.
51. F. Bernardi, P. Arcieri, R. Bertina, F. Chiarotti, J. Corral, M. Pinotti, H. Prydz, M. Samama, P. Sandset, R. Strom, V. Vicente, G. Mariani. Contribution of Factor VII genotype to activated FVII levels. Differences in genotype frequencies between northern and southern European population. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17:2548-2553, 1997.

52. J. Corral, R. González-Conejero, M.L. Lozano, J. Rivera, V. Vicente. Factor VII genotype is not associated with thromboembolic diseases. *Blood Coag. Fibrinol.* 9:267-272, 1998
53. R. González-Conejero, J. Corral, M.L. Lozano, J. Rivera, J.M. Moraleda, V. Vicente. Polimorphisms of platelet glycoprotein Ib associated with arterial thrombotic disease. *Blood.* 92:2771-2776, 1998.
- 54 J. Corral, R. González-Conejero, J. Rivera y V. Vicente. Polimorfismos genéticos de receptores adhesivos plaquetarios: su relación con la enfermedad tromboembólica. *Haematologica.* 83 (Suppl 1):469-475, 1998.
55. V. Vicente, J. Corral, R. González-Conejero y J. Rivera. Variaciones genéticas de los factores de coagulación II, V y VII relacionados con trombofilia. *Haematologica.* 83 (Suppl 1):476-481, 1998.
56. J. Corral, R. González-Conejero, J. Rivera, F. Ortuño, P. Aparicio, V. Vicente. Role of the 807 C/T polymorphism of the $\beta 2$ gene in platelet GPIa collagen receptor expression and function: effect in thromboembolic diseases. *Thromb. Haemost.* 81:951-956, 1999.
57. J. Corral, J. Rivera, R. González-Conejero, V. Vicente. The platelet GPIa receptor density associates with the genetically linked 807 C/T and HPA-5 polymorphisms. *Transfusion.* 39:372-378, 1999.
58. G. Mariani, F. Bernardi, R. Bertina, V. Vicente, H. Prydz, M. Samama, PM Sandset, GD Di Nucci, MG Testa, B Bendz, F Chiarotti, MV Ciarla, R Strom. Serum phospholipids are the main environmental determinants of activated factor VII in the most common FVII genotype. *Haematologica.* 84:620-626. 1999.
59. G. Mariani, F. Bernardi, R. Bertina, V. Vicente, H. Prydz, M. Samama, P.M. Sandset, G.D. Di Nucci, M.G. Testa, F. Chiarotti, M.V. Ciarla, R. Strom. A multiethnic study on the relation between factor VII, tissue factor pathway inhibitor, other haemostatic variables and lipids. A major role for phospholipids. *Arterioscler. Thomb. Vasc. Biol.* 19:2024-2028, 1999.
60. J.A. Iniesta, J. Corral, R. González-Conejero, J. Rivera, V. Vicente. Prothrombotic genetic risk factors in patients with coexisting migraine and ischaemic cerebrovascular disease. *Headache.* 39:486-489, 1999.
61. J. Corral, R. González-Conejero, J.A. Iniesta, J. Rivera. C. Martínez, V. Vicente. The FXIII Val34Leu polymorphism in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica.* 85:293-297, 2000.
62. J. Corral, M.L. Lozano, R. González-Conejero, C. Martínez, J.A. Iniesta, J. Rivera, V. Vicente. A common polymorphism flanking the ATG initiator codon of GPIIb does not affect expression and is not a major risk for arterial thrombosis. *Thromb. Haemost.* 83:23-28, 2000.
63. R. González-Conejero, M.L. Lozano, J. Corral, C. Martínez, V. Vicente. The TFPI 536C--T mutation is not associated with increased risk for venous or arterial thrombosis. *Thromb. Haemost.* 83:787-788, 2000.
64. J. Corral, J.A. Iniesta, R. González-Conejero, M. Villalón, J. Rivera, V. Vicente. Factor XIII Val34Leu polymorphism in primary intracerebral haemorrhage. *Hematol. J.* 1:269-273, 2000.
65. J. Corral, J.A. Iniesta, R. González-Conejero, M. Villalón, V. Vicente. Polymorphisms of clotting factors modify the risk of primary intracranial hemorrhage. *Blood* 97:2979-2982, 2001
66. M.L. Lozano, R. González-Conejero, J. Corral, J. Rivera, J.A. Iniesta, C. Martínez, V. Vicente. Polymorphisms of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) are associated with neutrophil-platelet adhesion and ischaemic cerebrovascular disease. *Br. J. Haematol.* 115:969-976, 2001.

67. J.A. Iniesta, J. Corral, R. González-Conejero, V. Vicente. Role of factor XIII Val34Leu polymorphism in patients with migraine. *Cephalalgia*. 21:837-841, 2001.
68. R. González-Conejero, J. Corral, V. Roldán, C. Martínez, F. marín, J. Rivera, J.A. Iniesta, M.L. Lozano, P. Marco, V. Vicente. A common polymorphism in the annexin V Kozak sequence (-1C to T) increases translation efficiency and plasma levels of annexin V, and decreases the risk of myocardial infarction in young patients. *Blood* 100:2081-86; 2002.
69. V. Roldán, J. Corral, F. Marín, J. Rivera, V. Vicente. Effect of Factor XIII Val34Leu polymorphism on thrombolytic therapy in premature myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* 88:354-5, 2002.
70. E. Pérez, J. Corral, , I. Alberca, Vayá A, Llamas P, Montes R, R. González-Conejero V. Vicente. The prothrombin A19911G polymorphism modifies the risk of venous thrombosis determined by the G20210A polymorphism. *Br. J. Haematol.* 118:610-614, 2002.
71. J. A. Iniesta, J. Corral, R. González-Conejero, C. Piqueras, V. Vicente. Polymorphisms of platelet adhesive receptors: Do they play a role in primary intracerebral hemorrhage?. *Cerebrovasc. Dis.* 15:51-55, 2003.
72. V. Rodán, J. Corral, F. Marín, J. Rivera, J. Pineda, R. González-Conejero, F. Soborg, V. Vicente. Role of Factor XIII Val34Leu polymorphism in patient<45 yeras of age with acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 91:1242-1245, 2003.
73. R. González-Conejero, J. Corral, V. Roldán, C. Martínez, F. Marín, J. Rivera, J.A. Iniesta, M.L. Lozano, P. Marco, V. Vicente. Annexin V polymorphisms, plasma levels, and myocardial infarction. *Blood* 101:4224-4225, 2003.
74. S.S. Santoso. Platelet surface collagen receptor polymorphisms: variable receptor expresión and thrombotic/hemorrhagic risk. *Blood* 93:3575-3577, 1999.
75. E.J. Weiss, P.F. Bray, M. Tayback, S.P. Shulman, T.S. Kickler, L.C. Becker, J.L. Weiss, G. Gerstenblith, P.J. Goldschmidt-Clermont. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 334:1090-1094, 1996.
76. T.W. Meade, S. Mellows, M. Brozovic, G.J. Miller, R.R. Chakrabarti, W.R.S. North. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 2:533-537, 1986.
77. L. Iacovello, A. Di Castelnuovo, P. de Knijff, A. D'Orazio, C. Amore, R. Arboretti. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 338:79-85,1998.
78. R.E. Simmonds, J. Hermida, S.M. Rezende, D.A. Lane. Haemostatic Genetic risk factors in arterial thrombosis. *Thromb. Haemost.* 86:374-385, 2001.
79. T. Kanaji, T. Okamura, K. Osaki, M. Kuroiwa, K. Shimoda, N. Hamasaki. Common genetic polymorphism (C46 to T substitution) in the 5-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood* 91:2010-2014, 1998.
80. J.M. Soria, L. Almasy, J.C. Souto, D. Bacq, A. Buil, A. Faure, E. Martínez-Merchám, J. Mateo, M. Borrell, W. Stone, M. Lathrop, J. Fontcuberta, J.A. Blangero. A quantitative-trait locus in the human factor

XII gene influences both plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease. *Am. Hum. Genet.* 70:567-574, 2002.

81. V. Rodán, J. Corral, F. Marín, J. Pineda, V. Vicente, R. González-Conejero. Synergistic association between hipercolesterolemia and a common C46T polymorphism in the Kozak region of Factor XII for developing premature myocardial infarction. *Heart* (En Prensa).

82. R.A.S. Ariëns, H. Philippou, C. Nagaswami, J.W. Weisel, D.A. Lane, P.J. Grant. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood* 96:988-995, 2000.

83. H.A.M. Endree, M.C.A. Stuart, W.T. Hermens. Clustering of lipid-bound annexin V may explain its anticoagulant effect. *J. Biol. Chem.* 267:17907-17912, 1992.

84. H. Kenis, C.J.M. Doggen, H.L. Vos, C.P.M. Reutelingsperger, W.L. Van Heerde. The C-1T mutation in the annexin A5 Kozak sequence slightly increases the risk of myocardial infarction in men. *J. Thromb. Haemost.* 1:2688-2689, 2003.

85. C. Butt, H. Zheng, E. Randell, D. Robb, P. Parfrey, Y.G. Xie. Combined carrier status of prothrombin 20210A and factor XIII-A Leu34 alleles and a strong risk factor for myocardial infarction: evidence of a gene-gene interaction. *Blood* 101:3037-3041, 2003.

86. J.A. Carew, F. Basso, G.J. Miller, E. Hawe, A.A. Jackson, S.E. Humphries. A functional haplotype in the 5' flanking region of the factor VII gene is associated with an increased risk of coronary heart disease. *J. Thromb. Haemost.* 1:2179-2185, 2003.

87. L. Iacovello, A. Di Castelnuovo, A. D'Orazio, M.B. Donati. Cigarette smoking doubles the risk of myocardial infarction in carriers of a protective polymorphism in the Blood coagulation factor VII gene. *Thromb. Haemost.* 81:658, 1999.

88. B.C. Tanis, H.J. Blom, D.G.M. Bloemenkam, M.A.A. van den Bosch, A. Algra, Y. van der Graaf, F.R. Rosendaal. Folate, homocysteine levels, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C—T variant, and the risk of myocardial infarction in young women: effect of female hormones on homocysteine levels. *J. Thromb. Haemost.* 2:35-41, 2004.

89. I. Behague, O. Poirier, V. Nicaud. B-fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. *Circulation* 93:440-444, 1996.

90. P.G. Lindquist, P.J. Svenson, B. Dahlback, K. Marsal. Factor V Q506 mutation (activated protein C resistance) associated with reduced intrapartum Blood loss—a possible evolutionary selection mechanism. *Thromb. Haemost.* 79:69-73, 1998.

91. P.G. Lindquist, B. Zoller, B. Dahlback. Improved hemoglobin status and reduced menstrual blood loss among female carriers of FV Leiden—a evolutionary advantage?. *Thromb. Haemost.* 86:1122-1123, 2001.

92. W. Gopel, L. Gortner, T. Colman, C. Shultz, J. Moller. Low prevalence of large intraventricular haemorrhage in very low birthweight infants carrying the factor V Leiden or prothrombin G20210A mutation. *Acta Paediatr* 90:1021-1024, 2001.

93. C. Escuriola, S. Halimeh, K. Kurnik. Symptomatic onset of severe hemophilia A in childhood is dependent on the presence of prothrombotic risk factors. *Thromb. Haemost.* 85:218-220, 2001.

94. E.F. Tizzano, J.M. Soria, I. Coll, B. Guzman, M. Cornet, C. Altisent. The prothrombin 20210A allele influences clinical manifestations of hemophilia A in patients with intron 22 inversion and without inhibitors. *Haematologica* 87:279-285, 2002.
95. W. Gopel, M. Ludwig, A.K. Junge, T. Kholman, K. Dietrich, J. Moller. Selection pressure for the factor V-Leiden mutation and embryo implantation. *Lancet* 358:1238-1239, 2001.
96. J.J. McCarthy, R. Hilfiker. The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics. *Nat. Biotechnol.* 18:505-508, 2000.
97. W.E. Evans, J.A. Johnson. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu. Rev. Genomics Hum. Gene.* 2:9-39, 2001.
98. K.A. Phillips, D.L. Veentra, E. Owen, J.K. Lee, W. Sadee. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse reactions: a systematic review. *JAMA* 286:2270-2279, 2001.
99. I.P. Fohr, R. Prinz, A. Bronstrup, A.M. Bohlmann, H. Nau, H.K. Berthold. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase genotype determines the plasma homocysteine-lowering effect of supplementation with 5-methyltetrahydrofolate or folic acid in healthy young women. *Am. J. Clin. Nutr.* 75:275-282, 2002.
100. J. Hermida, J. Zarza, I. Alberca, R. Montes, M.L. López, E. Molina, E. Rocha. Differential effects of 2C9*3 and 2C9*2 variants of cytochrome P-450 CYP2C9 on sensitivity to acenocumarol. *Blood* 99:4237-4239, 2002.
101. V. Rodán, J. Corral, J. Sánchez-Payá, V. Vicente, R. González-Conejero. Effect of factor VII -323 Del/Ins polymorphism on diurnal variation of FVIIc and INR in steady anticoagulated patients with atrial fibrillation. *Stroke* (En Prensa).
102. G.E. Cooke, P.F. Bray, J.D. Hamlington, D.M. Pham, P.J. Goldschmidt-Clermont. PLA-2 polymorphism and efficacy of aspirin. *Lancet.* 351:1253, 1998.
103. D.H. Walter, V. Schachinger, M. Elsner, S. Mach, S. Dimmeler, W. Auch-Schwel. Statin therapy is associated with reduced restenosis rate after coronary stent implantation in carriers of the PLA-2 allele of the platelet glycoprotein IIIa gene. *Eur. Heart J.* 22:587-595, 2001.
104. G.L. Wheeler, G.A. Braden, P.F. Bray, S.J. Marciniak, M.A. Macelli, D.C. Sane. Reduced inhibition by abciximab in platelets with the PLA-2 polymorphism. *Am. Heart J.* 143:76-82, 2002.
105. J. Rivera, M.L. Lozano, J. Corral, R. González-Conejero, C. Martínez, V. Vicente. The platelet GPIb/IX/V complex: physiological role. *J. Physiol. Biochem.* 56:355-366, 2000.
106. V. Vicente, R. Houghten, Z.M. Ruggeri.- Localization of a von Willebrand Factor-binding site between residues Ser251-Tyr279 of the alpha chain of platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* 265:274-280, 1990.
107. D. Cheresh, S. Berliner, V. Vicente, Z.M. Ruggeri.- Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell.* 58:945-953, 1989.

108. W. Burke. Genomics as a probe for disease biology. *N. Engl. J. Med.* 349:969-974, 2003.

109. V. Mooser, D.M. Waterworth, T. Isenhour, L. Middlenton. Cardiovascular pharmacogenetics in the SNP era. *J. Thromb. Hemost.* 1:1398-1402, 2003.