

**XVII LECCIÓN  
CONMEMORATIVA  
ANTONIO RAICHS**

# EL EQUILIBRIO HEMOSTÁTICO, UN PROCESO COMPLEJO Y DINÁMICO

V. VICENTE GARCÍA

Unidad de Hematología y Oncología Médica. Hospital Universitario Morales Meseguer. Murcia.

## Introducción

La hemorragia ha sido un elemento destacado desde los primeros vestigios de la civilización. En las pinturas del paleolítico que adornan las cuevas de Altamira, el sangrado en los animales es una imagen habitual. Por otra parte, a lo largo de la historia ha existido un interés constante por aclarar los mecanismos responsables de la hemorragia<sup>1</sup>. Este hecho contrasta con el escaso interés despertado por la trombosis durante siglos<sup>2</sup>. Hoy en día, sin embargo, su estudio concita grandes esfuerzos al ser la mayor causa de mortalidad<sup>3</sup>.

Como muchos otros aspectos de la medicina moderna, el conocimiento de los mecanismos reguladores del sistema hemostático comenzó a ser entendido a lo largo del siglo pasado. Durante los últimos 25 años se ha puesto en evidencia la tremenda complejidad del sistema, en el que participan un amplio número de proteínas plasmáticas y celulares promiscuas y versátiles. Precisamente esa complejidad ha sido incluso utilizada como argumento de discusión entre las corrientes filosóficas de los “creacionistas” frente a los “evolucionistas”<sup>4</sup>.

El sistema hemostático más sencillo del que tenemos constancia es el del limulus, un “fósil vivo” de 500 millones de años de antigüedad<sup>5</sup>. Su sistema hemostático se circunscribe a sus células circulantes (hemocitos), cuya función es la de formar un tapón reforzado por una proteína gelatinosa conocida como coagulina, ante agresiones externas o en respuesta a una invasión de endotoxina. Un sistema tan simple, presenta ya algunas de las características propias del sistema totalmente desarrollado de los vertebrados superiores. Por una parte, anuncia la cascada enzimática de la coagulación sanguínea, donde una proteína precursora de la coagulina, el coagulógeno, es sensible a una serinoproteasa conocida como coagulasa, para dar lugar de forma inmediata a la formación del coágulo y prevenir la exanguinación. Por otra parte, al hemocito lo podemos imaginar como un progenitor de la plaqueta.

Se ha construido una ruta de evolución del sistema hemostático, cuyo mecanismo de ensamblaje, mediante la duplicación de genes y la combinación aleatoria de exones, tuvo lugar durante un período de unos 50 millones de años. Durante los siguientes

450 millones de años el sistema hemostático solamente ha experimentado pequeñas modificaciones<sup>6</sup>. Ello explica el alto grado de homología entre las proteínas que forman parte del propio sistema de coagulación y las pequeñas diferencias observadas entre especies.

El sistema hemostático constituye un activo y dinámico mecanismo de defensa del organismo con la función de mantener constantemente permeable la luz vascular, restablecerla en caso de obstrucción por un fenómeno trombótico y de reparar la lesión en la pared del vaso para impedir una excesiva pérdida sanguínea. Las manifestaciones clínicas de su desequilibrio serán la tendencia hemorrágica o la trombótica. El conocimiento del sistema es todavía muy limitado, y si bien se van definiendo las bases para su entendimiento, estamos lejos de conseguir asimilar las íntimas y múltiples interacciones entre sus proteínas, agrupadas clásicamente como proteínas procoagulantes, anticoagulantes y fibrinolíticas, así como su relación con otros sistemas igualmente complejos como el inmune, inflamatorio, tumoral, etc.

Como en cualquier sistema biológico complejo, en el sistema hemostático se pueden establecer tres etapas de desarrollo. La primera corresponde al período descriptivo o de identificación de elementos implicados en el sistema (*fase descriptiva*). La segunda, busca la explicación de la interacción o conexión entre los elementos descritos (*fase de interacción*), y la tercera (*fase de integración*) pretende agrupar todos los conocimientos conseguidos, para obtener una visión global que explique de forma dinámica e integrada el papel de las diferentes piezas de este complejo puzzle y su relación con la realidad de la clínica hemorrágica y trombótica.

La investigación del sistema hemostático es un claro ejemplo de estudio translacional. Con el análisis de las enfermedades hemorrágicas, y más tarde de las trombóticas, se obtuvo información para establecer la estructura básica del sistema. En la actualidad, la genómica constituye una fuente importante de conocimiento, a la que se ha sumado la proteómica. Su vinculación con los estudios epidemiológicos intentan ligar la realidad clínica con los hallazgos de carácter más básicos. Como buen ejemplo de investigación translacional, se vislumbra un círculo

que tiende a cerrarse con la integración de los conocimientos de cada una de las áreas de bioquímica, biología celular, genómica, proteómica, epidemiología clínica y molecular, lo que aportará un conocimiento más exacto de los mecanismos de enfermedad hemorrágica y trombótica y nos traerá nuevas aproximaciones terapéuticas a través de la farmacogenética, terapia génica, etc., para el beneficio de nuestros enfermos.

Aquí, solamente esbozamos algunos de los logros conseguidos y de los muchos problemas aún por resolver en el complejo sistema hemostático. Su análisis reafirma la importancia de seguir una nueva estrategia de estudio, que implica una investigación coordinada e integrada de todas las áreas mencionadas.

### Fase descriptiva

#### *Identificación de los elementos del sistema hemostático*

El estudio de las diátesis hemorrágicas identificó a numerosas proteínas del sistema de la coagulación sanguínea, y dio soporte a la interacción proteína/proteína(s), endotelio/plaqueta y plaqueta/plaqueta. Los sucesivos avances justifican el cambio desde un sencillo modelo de sistema de coagulación propuesto por Morawitz<sup>7</sup>, al complejo y dinámico sistema aceptado en nuestros días<sup>8-10</sup>.

En los años 1960, estudiando familias con una intensa presencia entre sus miembros de episodios de trombosis venosa, se identificó por primera vez una proteína con actividad anticoagulante del sistema hemostático, la antitrombina<sup>11</sup>. Veinte años más tarde, el estudio de otras familias facilitó la descripción del principal sistema anticoagulante del organismo, el sistema de la proteína C, cuya deficiencia en alguna de sus proteínas también ocasiona un estado de trombofilia<sup>12-14</sup>.

Muchos de estos conocimientos se generaron con la puesta en marcha de técnicas sencillas pero no exentas de imaginación, como el tiempo de protrombina (TP), tromboplastina parcial (TTP) y TTP activado (TTPA). El TTP ha sido pieza clave en la dosificación de actividades enzimáticas atribuidas a los nuevos factores de coagulación, y ha definido una era de la coagulación sanguínea<sup>15</sup>. La incorporación de nueva metodología como los sustratos cromogénicos, la electroinmunodifusión de Laurell, la electroforesis bidimensional, y otras técnicas electroforéticas, propiciaron la descripción de variantes moleculares. Las técnicas de agregación plaquetaria enriquecieron la patología del sistema hemostático en su vertiente hemorrágica.

#### *Estudios epidemiológicos*

##### *Niveles de proteínas de coagulación y riesgo de trombosis*

Cuando se dispuso de la primera visión estable, aunque incompleta, del sistema hemostático, se rea-

lizaron estudios epidemiológicos buscando la relación entre los niveles plasmáticos de factores de coagulación y/o el número de plaquetas, con el riesgo de enfermedad tromboembólica, tanto en su vertiente arterial como venosa. Los primeros estudios identificaron los niveles elevados de fibrinógeno y de FVII como marcadores independiente de riesgo de enfermedad vascular arterial<sup>16</sup>. Numerosos estudios prospectivos posteriores solamente confirmaron los niveles elevados de fibrinógeno como factor de riesgo<sup>17</sup>. Recientemente, elevaciones del FVIII, FIX y FXI se han asociado con un riesgo incrementado de trombosis venosa profunda<sup>18,19</sup> e incluso se sugiere que pueden predecir un mayor riesgo de recurrencia<sup>20</sup>. En este sentido, un estudio epidemiológico que incluye un amplio número de mujeres portadoras de hemofilia A y B, que tienen un nivel reducido de FVIII o FIX respectivamente, muestra que tienen una menor tendencia a sufrir enfermedad vascular coronaria<sup>21</sup>. Es de interés haber detectado que el fibrinógeno presenta oscilaciones importantes dependiendo de la estación del año, y observar que los períodos de sus niveles más elevados, invierno, coinciden con una mayor incidencia de episodios vasculares<sup>23</sup>. Será de gran interés epidemiológico confirmar si la influencia de los ritmos "circanuales" e incluso "circadianos" en otras proteínas del sistema hemostático podrían condicionar la tendencia hemorrágica o trombótica.

##### *Factores ambientales*

Los estudios epidemiológicos también han establecido una serie de factores ambientales que aumentan el riesgo de trombosis arterial, como el fumar, la obesidad, la hipercolesterolemia y la diabetes<sup>17</sup>, y otros para la trombosis venosa, como los anticonceptivos orales, la inmovilización, antecedentes quirúrgicos, etc.<sup>19,22</sup>.

##### *Estudios genéticos*

La aplicación de las técnicas de genética molecular ha supuesto un punto de inflexión en la adquisición de conocimientos en este campo. Las primeras alteraciones genéticas identificadas se asociaron a coagulopatías y trombopatías congénitas y estados de trombofilia hereditaria, datos que son recogidos de forma sistemática en los bancos de datos electrónicos [[www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed)]<sup>24-28</sup>. La identificación de las anomalías moleculares son de gran ayuda para definir la relación estructura/función de las diferentes proteínas y para comprender la expresión clínica de la enfermedad<sup>29</sup>. Un buen ejemplo es la hemofilia A donde diferentes variaciones genéticas condicionan la gravedad del cuadro hemorrágico. Cuando el resultado de la mutación ocasiona la pérdida completa de FVIII, causado por una gran delección del gen o inversión de material genético, el cuadro clínico es más grave. Por el contrario, mutaciones puntuales que ocasionan el cambio

de un aminoácido en la estructura de la proteína madura puede asociarse con cuadros hemorrágicos moderados o leves. Otro ejemplo son las disfibrinogenemias, donde algunas variantes moleculares ocasionan un coágulo más resistente a la fibrinólisis, y por tanto facilitan el tromboembolismo arterial<sup>30</sup>.

*Polimorfismos genéticos y sistema hemostático*

La información proporcionada por la genómica esta permitiendo identificar variaciones comunes en la secuencia del ADN, que son consecuencia de errores en la replicación y reparación del ADN a lo largo del tiempo. 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. El interés por los SNP en los diferentes campos de la medicina ha sido enorme por la vinculación que pueden tener en la manifestación de un determinado fenotipo. El número de SPN descritos pasa de unos miles hace escasamente 5 años, a los actuales casi 3 millones incluidos en diferentes bases de datos. 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<sup>32</sup>.

La mayoría de los polimorfismos se localizan en regiones poco trascendentes de los genes y se piensa que no afectan su función o los 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. Junto a éstos, hay otros localizados en regiones reguladoras o codificantes, que afectan los procesos de transcripción, estabilidad del ARN, traducción, procesos postraduccionales, estabilidad, estructura, o función de la proteína. Son los llamados polimorfismos funcionales. Para aportar una idea del interés alcanzado en este campo, basta comprobar el material publicado. Al realizar una búsqueda durante el mes de junio en la base de datos “Pubmed”, introduciendo las palabras “*polymorphism & cardiovascular*”, obtuvimos 2.368 publicaciones; si se opta por incluir “*polymorphism & thrombosis*” alcanzamos 808 trabajos más publicados.

*Estudios de asociación*

La estrategia mayoritariamente utilizada para conseguir información sobre la relevancia de las variaciones genéticas han sido los clásicos estudios de “asociación”, que comparan la presencia de un determinado polimorfismo en individuos sanos (controles) y enfermos (casos), no emparentados entre ellos. Este tipo de estudios se ha visto sometido a

Tabla 1. Algunos de los genes que han sido implicados en la enfermedad tromboembólica arterial y venosa

|  |
|--|
| <i>Coagulación</i>   |
| Fibrinógeno, protrombina, FV, FVII, FXII, FXIIIa, PAI.-1, tPA, trombomodulina, proteína C, proteína S, antitrombina, receptor de proteína C endotelial (EPCR), inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI)   |
| <i>Plaquetas</i>   |
| GPIIIa, GPIb $\alpha$ , GPIa, GPVI   |
| <i>Moléculas de adhesión</i>   |
| Selectina P, selectina E, ligando-1 de la glucoproteína selectina P (PSGL-1)   |
| <i>Metaloproteasas (MMP)</i>   |
| MMP2, MMP3, MMP9, MMP12  |
| <i>Sistema renina-angiotensiva</i>   |
| ACE, angiotensinógeno  |
| <i>Inflamación</i>   |
| CCR5, CCR2, CD18, CD14, IL6, TNF- $\alpha$   |
| <i>Lípidos</i>   |
| Paraxonasa, apolipoproteína E  |
| <i>Otros</i>   |
| Anexina V, metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR), glutatión S transferasa, $\alpha$ -aducina, aldosterasa sintetasa, IGF-1, colágeno tipo III, ENos, RAGE, $\alpha$ -estrógeno R, glutaminato-cisteína, modificadores de ligasas, TGF- $\beta$ , receptor $\beta$ -2 adrenérgico |

una serie de críticas, como es la selección “intuitiva” del gen candidato, asumiendo que el polimorfismo elegido es funcional, aunque no haya evidencia fisiológica o bioquímica suficiente, y no valora la posibilidad de que esté ligado a otra alteración génica. Además, también han surgido reparos relativos al procedimiento de estratificación de casos y controles, al tamaño de las muestras, etc.<sup>32,33</sup>. Pese a todo, es innegable que los estudios de “asociación” han sido una herramienta de gran utilidad para identificar factores de riesgo de trombosis venosa, como el Factor V Leiden y la protrombina 20210A<sup>34,35</sup>, manifestar polimorfismos reguladores de los valores plasmáticos de factores de coagulación como el fibrinógeno, Factor VII, protrombina<sup>36,37</sup>, y mostrar polimorfismos que afectan la expresión y función de receptores adhesivos plaquetarios<sup>38-41</sup>. Se han identificado una gran cantidad de polimorfismos de genes reguladores o modificadores de proteínas del sistema hemostático, del inflamatorio, etc., todos ellos “candidatos” a definir riesgo trombótico bien arterial o venoso<sup>37,42,43</sup>. También se han descrito otros que podrían disminuir el riesgo de enfermedad vascular arterial<sup>44-46</sup>. La tabla 1 refleja algunos de los polimorfismos genéticos que se han asociado con un mayor riesgo trombótico.

### Estudios de ligamiento

La otra estrategia, aparecida más tarde y que implica una mayor complejidad, es la de los estudios de "ligamiento" o vinculación. Su fundamento descansa en la genética de rasgos cuantitativos analizados en familias o hermanos gemelos. Son básicamente estudios de ligamiento genético que permiten demostrar la cosegregación de una enfermedad y las variantes genéticas responsables. Persiguen establecer relaciones más sólidas de causa-efecto, y también analizar genes candidatos con mayor seguridad que los estudios de "asociación"<sup>33,48</sup>. 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 conocen como QTL (*Quantitative Trait Locus*).

Para este tipo de análisis se pueden aplicar diferentes diseños: estudio de gemelos, pares de hermanos o familias extensas, utilizando diferentes técnicas estadísticas para realizar análisis de ligamiento genético<sup>33,48,58</sup>. Los inconvenientes atribuidos a esta aproximación metodológica radican especialmente en la gran dificultad para encontrar familias suficientemente grandes que puedan ser informativas, y al igual que con los estudios de "asociación", los análisis de "ligamiento" tampoco son suficientes para demostrar una relación inequívoca causa-efecto, a menos que se realicen estudios funcionales<sup>49</sup>.

El trabajo que se viene realizando en el seno del proyecto GAIT (*Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia*) es modélico en este campo, ha diseñado una coherente estrategia de estudio de 21 familias españolas, 12 de ellas portadoras de un estado de trombofilia. El primer paso fue la identificación de la heredabilidad de un amplio número de proteínas del sistema hemostático<sup>50</sup>, para después establecer un rastreo genómico ordenado buscando la asociación de QTL concretos con niveles plasmáticos de factores de coagulación o vinculados a riesgo de trombosis<sup>51-53</sup>. Esta aproximación metodológica, que recientemente ha comenzado a ser utilizada por otros grupos<sup>54-57</sup> está aportando notables contribuciones en la identificación de lugares "calientes" de genes que hasta ahora no se habían relacionado con el sistema hemostático y que podrían participar en la definición de riesgo trombótico<sup>51,52,57</sup>. En definitiva, los estudios de "ligamiento" parecen aportar una aproximación de estudio más ajustada para enfermedades complejas como la trombosis, donde el concepto de enfermedad "oligogénica" parece muy apropiado, ya que define una situación donde influyen múltiples genes en la descripción de un rasgo, y solamente algunos de ellos tienen un efecto lo suficientemente importante para poder ser detectados<sup>48</sup>.

### Fase de interacción

La consecuencia inmediata de la identificación de los elementos que participan en el sistema hemostático es la búsqueda de su interacción para explicar

de una forma adecuada el proceso fisiológico de la hemostasia, y su manifestación patológica expresada por la tendencia a la hemorragia y trombosis. Aunque se han conseguido notables avances, son insuficientes para poder entender esos procesos.

### Sistema de la coagulación sanguínea

#### Sistema enzimático y generación de trombina

El objetivo de la cascada enzimática de la coagulación sanguínea es el paso de la proteína soluble plasmática, el fibrinógeno, a una insoluble, la fibrina. Los estudios bioquímicos han desterrado la idea mantenida durante años, más académica que real, de la existencia de dos sistemas de activación del sistema de coagulación, la vía extrínseca e intrínseca. Ahora está generalmente aceptado que el factor tisular (FT) es el principal desencadenante *in vivo* de la activación de la coagulación sanguínea. En la activación del sistema se han perfilado dos fases bien diferenciadas, la de iniciación y la de propagación<sup>9</sup>. En la primera de ellas, tras la interacción del FT con trazas circulantes de FVIIa se generan pequeñas cantidades del FXa, FIXa y trombina en las membranas celulares. La cantidad de trombina producida es también responsable de la activación plaquetaria. Esta última proteína activa a los cofactores de la coagulación V y VIII que desempeñarán un papel importante y amplificador de generación de trombina –más del 95 % se genera en el período de propagación– responsable directa de la aparición de fibrina. El sistema esta modulado fundamentalmente a tres niveles; por el inhibidor del factor tisular, principal regulador de la generación de FXa, la antitrombina que es el inhibidor más relevante de la trombina, y la proteína C activada (PCA) pieza fundamental en la destrucción de los dos cofactores activados, FVa y FVIIIa. Una revisión de las detalladas interacciones del sistema hemostático ha sido descrita recientemente<sup>9</sup>.

Un análisis detenido del sistema enzimático aportan información útil para entender el aumento de riesgo trombótico. Hasta hace no mucho tiempo se le ha dado muy poco valor predictivo a niveles plasmáticos elevados de coagulación. Elegantes estudios bioquímicos indican que fluctuaciones ligeras de determinados factores de coagulación, incluso los existentes en la población considerada normal, pueden tener una amplia repercusión en la generación de trombina<sup>59,60</sup>. Adicionalmente, se han obtenido evidencias experimentales sobre los mecanismos que pueden aumentar el riesgo de trombosis en casos de trombofilia hereditaria venosa. Así, pacientes con FV Leiden o hiperprotrombinemia asociada al genotipo protrombina 20210A generan una mayor cantidad de trombina<sup>63,64</sup>, y además, en la última situación también hay una inhibición de la fibrinólisis plasmática a través de un mecanismo asociado con trombina (TAFI)<sup>65</sup>.

*Pruebas biológicas de hemostasia y animales transgénicos*

Desgraciadamente, las pruebas de hemostasia que venimos utilizando desde hace años, no son muy poco demostrativas, e incluso han llegado a ser consideradas como una posible consecuencia de artefactos *in vitro*<sup>9</sup>. El TP y TTPA detectan la generación de las primeras hebras de fibrina, que aparecen en la fase de iniciación, cuando todavía no se ha alcanzado el 5% de la reacción enzimática completa. El TP es insensible en deficiencias congénitas para generar trombina como las hemofilias graves. Por el contrario el TTPA está notablemente prolongado en deficiencias hemostáticas con nula o muy poca repercusión hemorrágica, como en el déficit de FXII, precalicreína, etc. También son pruebas ineficaces para reflejar el grado de inhibición de generación de trombina con diferentes terapias como heparinas de bajo peso molecular o nuevas antitrombinas, como el ximelatrán.

La comparación de las proteínas implicadas en la generación de trombina entre humanos y animales ha mostrado también diferencias sustanciales. Así pues, ratones transgénicos totalmente deficientes en proteínas cruciales de la vía del factor tisular, como FT, FVII, FX, FX, FV y FII no llegan a nacer, indicando el papel esencial de la formación de trombina para su desarrollo y viabilidad<sup>9</sup>. Por el contrario, en humanos las mismas anomalías solamente producen manifestaciones hemorrágicas con un amplio rango de severidad clínica. Esta diferencia ha sido atribuida a la versatilidad del sistema hemostático humano capaz de buscar vías alternativas de generación de trombina, evitando la letalidad observada en ratones.

Por el contrario, ha sido de interés comprobar como un modelo de ratón transgénico de hiperfibrinogenemia moderada, es capaz de producir un aumento de depósito de fibrina en determinados órganos, y ante circunstancias de estasis vascular induce hiperplasia en la neointima vascular<sup>61</sup>. Estos estudios son un notable avance para entender cómo un aumento constitucional de fibrinógeno modifica la generación de fibrina y el remodelado de la pared vascular. Queda por aclarar si tales cambios dependen de la desregulación de los genes que controlan el metabolismo del fibrinógeno, y si la hiperfibrinogenemia definitivamente contribuye al desarrollo de enfermedad aterogénica<sup>61</sup>. Estudios similares nos ayudarán a contestar si el aumento del nivel de algunas proteínas de coagulación facilitan la aparición de trombosis venosa profunda<sup>18,19,62</sup>.

**Promiscuidad y versatilidad funcional de las proteínas del sistema hemostático**

*Promiscuidad*

Uno de los aspectos más destacables de algunas de las proteínas que participan en el sistema hemo-

Tabla 2. Algunas funciones que tiene asignadas la trombina<sup>8</sup>

|   |
|---|
| Conversión del fibrinógeno a monómeros de fibrina<br>Activación de los factores procoagulantes V, VII, VIII y XI<br>Estabilización de la malla de fibrina activando al FXIII<br>Inducir activación y secreción plaquetaria<br>Inducir activación y secreción endotelial<br>Aumento de síntesis y estimulación del factor tisular (FT)<br>Activar el sistema anticoagulante de la proteína C<br>Estimular el sistema anticoagulante dependiente del inhibidor del FT, anexina V y nexinas (PN-1 y PN-2)<br>Liberación del activador tisular del plasminógeno y activador del plasminógeno tipo urocinasa<br>Inducir liberación del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI)<br>Activación del inhibidor de fibrinólisis activado por trombina (TAFI)<br>Modifica la expresión endotelial de selectina E<br>Modifica la expresión de selectina P en plaquetas y endotelio<br>Induce liberación de prostaciclina y factor agregante plaquetario (PAF) del endotelio<br>Liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PGDF)<br>Proliferación de células endoteliales<br>Agente quimiotáctico de monocitos y neutrófilos<br>Actividad mitogénica de fibroblastos, macrófagos, linfocitos y células de músculo liso de pared vascular |
|---|

Tomada de Furlan<sup>8</sup>.

tático es su capacidad para desempeñar funciones diferentes, incluso antagónicas, y su capacidad de interacción con un número importante de proteínas<sup>8</sup>. La trombina es ejemplo de promiscuidad y versatilidad, pues conocemos su capacidad para interaccionar con 20 diferentes ligandos. Consecuentemente, sus funciones son dispares, desde la generación de fibrina, activación del sistema anticoagulante de la proteína C, inhibir la actividad fibrinolítica, activar plaquetas y células endoteliales, etc.<sup>8</sup> (tabla 2). El fibrinógeno también tiene capacidad de interaccionar con numerosas proteínas del sistema de la coagulación sanguínea –trombina, FXIIIa, activador tisular del plasminógeno, FXa, etc.– así como con receptores plaquetarios y endoteliales<sup>8,67</sup>. Receptores plaquetarios tienen sitios de unión para diferentes proteínas. Así, la glucoproteína de membrana plaquetaria GPIIb/IIIa es un importante receptor de unión para el factor von Willebrand (FvW) subendotelial, y a su vez también tiene un lugar de unión de alta afinidad para la trombina, lo que también le hace ser un actor importante en el mecanismo de adhesión al subendotelio y en el de activación plaquetaria<sup>68</sup>.

*Función antagónica*

El Factor V y la trombina son dos buenos ejemplos para explicar las funciones antagónicas que puede realizar una misma proteína. En la cascada de la coagulación sanguínea ambas proteínas tienen un

papel procoagulante, y las dos también son piezas importantes para un adecuado funcionamiento del sistema anticoagulante de la proteína C<sup>66</sup>.

#### *Versatilidad*

El FvW es una buena muestra de versatilidad funcional. Es la proteína transportadora del FVIII en el plasma; es pieza fundamental en la adhesión plaquetaria al subendotelio a través de su interacción con el colágeno y con la GPIb $\alpha$  plaquetaria, y es también capaz de competir con el fibrinógeno para inducir agregación plaquetaria<sup>69</sup>. Es de interés comprobar que el FvW no sufre una distribución homogénea a lo largo de todo el subendotelio vascular, lo que puede explicar la diferente capacidad "trombogénica" que se observa entre diferentes territorios vasculares. En el plasma existe un mecanismo de autorregulación del tamaño de los multímeros para impedir que la proteína sea demasiado adhesiva. La enzima "vigilante" es la metaloproteasa ADAMTS-13 (*A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 domains-13*), cuya ausencia congénita o adquirida es responsable de la presencia plasmática de multímeros de FvW excesivamente grandes, que inducen agregación plaquetaria, y desencadena la crisis oclusivas que caracterizan a la púrpura trombótica trombocitopénica (PTT)<sup>73</sup>.

Se ha considerado que un defecto en la multimerización es un factor responsable de la heterogeneidad de la enfermedad de von Willebrand (EwW)<sup>69,70</sup>. Recientemente se han indicado variaciones genéticas del FvW, que si bien no alteran directamente el proceso de multimerización, sí son capaces de modificar su propia susceptibilidad a la proteólisis por ADAMTS-13<sup>71,72,74</sup>. La existencia de variedades genéticas del FvW que condicionen una determinada "sensibilidad" a su proteólisis, facilita la especulación acerca de un nuevo mecanismo inductor de riesgo de trombosis arterial.

Todos los ejemplos citados son suficientemente demostrativos para poner de manifiesto la promiscuidad, versatilidad, e incluso la propia función antagónica que expresan un buen número de proteínas del sistema hemostático.

#### **Interacción gen/gen**

##### *La trombosis expresión de enfermedad oligogénica y multicausal*

Durante los últimos 10 años hemos asistido a una fase fundamentalmente descriptiva de identificación de modificaciones genéticas responsables de fenotipos clínicos y biológicos del sistema hemostático. Aunque adolecemos de estudios que demuestren de forma inequívoca la relación causa/efecto entre un polimorfismo genético y un determinado fenotipo clínico, es cierto que durante estos años se ha generado abundante información que nos ayuda a entender el carácter oligogénico y multicausal de la

enfermedad trombótica. Igualmente vislumbramos que la interacción entre diferentes genes es un factor a tener en consideración para valorar adecuadamente la diferente intensidad de expresión clínica de coagulopatías congénitas que tienen el mismo nivel de deficiencia de proteína. En definitiva, tenemos evidencias suficientes para establecer que las alteraciones hemorrágicas y trombóticas están moduladas por el diálogo de muchos genes entre sí, y que a su vez estos genes tienen la capacidad de interactuar con bastantes factores ambientales.

El cambio de visión de la trombosis venosa como enfermedad oligogénica en vez de monogénica, surge cuando se comprueba que el riesgo se incrementa poderosamente cuando coinciden dos o más variantes moleculares consideradas trombofílicas<sup>42,43,75</sup>. Ejemplos son la coincidencia de los polimorfismos FV Leiden y protrombina 20210A, o de algunos de estos dos polimorfismos con una mutación de antitrombina, proteína C o proteína S<sup>42,43,75,76</sup>. También, la combinación de FV Leiden y el haplotipo FV HR2<sup>77</sup> y la presencia de un determinado haplotipo del gen del FVII<sup>78</sup>.

El incremento de riesgo en trombosis arterial se ha vinculado al sinergismo génico de los polimorfismos 20210A con el FXIII-A Val34Leu<sup>79,80</sup>. Presumiblemente se identificarán nuevas asociaciones que ayudarán a desvelar el carácter multigénico del episodio trombótico, con participación tanto de genes considerados candidatos, como otros que se están identificando gracias a los estudios de ligamiento genético, genes modificadores, y que no sospechábamos que guardasen relación con el sistema hemostático. Los hallazgos deberán confirmarse con estudios funcionales que demuestren la relevancia biológica de los sinergismos encontrados.

##### *Modulación de la manifestación hemorrágica por interacción génica*

Las manifestaciones hemorrágicas de pacientes con diátesis hemorrágicas congénitas o adquiridas también parecen estar moduladas por una interacción génica. Así, las hemorragias de los pacientes con coagulopatías congénitas suelen guardar correlación con niveles reducidos de sus factores de coagulación. Sin embargo, algunos pacientes muestran un fenotipo hemorrágico diferente a otros enfermos con un perfil biológico similar. Una explicación para esta situación es la coexistencia con genotipos protrombóticos o hemorrágicos<sup>81-84</sup>.

Los individuos portadores del FV Leiden sangran menos si son sometidos a cirugía cardíaca<sup>85</sup>, así como hay una reducción en las pérdidas sanguíneas durante el parto y en la menstruación<sup>86,87</sup>. De igual manera, este polimorfismo y el de la protrombina 20210A son protectores para los episodios de hemorragia cerebral parenquimatosa<sup>88</sup> y el polimorfismo plaquetario HPA-1 protege de las hemorragias subaracnoideas<sup>89</sup>.

### **Interacción gen/factores ambientales**

Diferentes estudios epidemiológicos indican que la intervención activa y mantenida sobre determinados factores ambientales –control del tabaquismo, dieta, hipertensión, etc.– influyen notablemente el riesgo de enfermedad vascular, muy posiblemente a través de interacciones con múltiples genes que afectan la síntesis y secreción de proteínas que influyen en el riesgo oclusivo<sup>3</sup>. Demostrativos son los estudios de migración de poblaciones, que muestran que los emigrantes inicialmente mantienen la tasa de mortalidad similar a la de su país de origen, y alcanzan el riesgo de sus conciudadanos varios años después<sup>37,90</sup>.

Tenemos varias evidencias que sugieren que determinados factores ambientales modifican la expresión génica y repercuten en el riesgo trombótico<sup>37,42,43</sup>. Así, los anticonceptivos orales aumentan el riesgo de trombosis venosa, infarto de miocardio, accidente oclusivo cerebrovascular y enfermedad arterial periférica, especialmente durante el primer año de iniciar la terapia<sup>22</sup>. La aparición de trombosis venosa se multiplica si las mujeres en terapia son portadoras de FV Leiden, protrombina 20210A y otros estados de trombofilia hereditarios. El riesgo es mayor si se utilizan progestágenos de tercera generación en vez de segunda<sup>91</sup>.

El mecanismo biológico por el que se genera esta situación es desconocido, si bien es sabido que el uso de estrógenos afecta los niveles de algunos factores de coagulación, marcadores inflamatorios y niveles de lípidos plasmáticos<sup>22</sup>. Se ha observado que los anticonceptivos orales aumentan los niveles de FVII en portadoras de un genotipo concreto, y ese efecto está potenciado en presencia de concentraciones elevadas de fosfolípidos<sup>92</sup>. En este sentido, también hay datos que confirman la interacción de fosfolípidos séricos y tabaco con el genotipo de FVII<sup>93,94</sup>, y un efecto sinérgico de la hipercolesterolemia con el polimorfismo C46T del FXII<sup>95</sup>.

Las influencias ambientales y genéticas son importantes para determinar la estructura/función del coágulo de fibrina<sup>99</sup> y también para la expresión del fenotipo clínico de los pacientes homocigotos de FVL y deficientes en antitrombina<sup>76,98</sup>.

### **Farmacogenética y sistema hemostático**

La farmacogenética es una nueva disciplina que estudia la influencia genética en la respuesta farmacológica<sup>100</sup>, que aborda la posibilidad de actuar para prevenir los efectos adversos a drogas, y la 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. En este joven e interesante campo, se están identificando polimorfismos localizados en genes que codifican enzimas de la ruta de metabolización de los fárma-

cos, de los transportadores de las drogas, y de las dianas de los propios fármacos, lo que puede condicionar la respuesta terapéutica<sup>100,101</sup>. 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 de la enzima metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) C677T modula los niveles plasmáticos de homocisteína, cuyo nivel elevado es para algunos un factor de riesgo trombótico<sup>102</sup>. 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 más eficaces en sujetos con genotipo homocigoto T/T que en C/T o C/C<sup>103</sup>.

Es bien conocida la disparidad de respuesta terapéutica al acenocumarol y warfarina entre individuos, la variabilidad ha sido tradicionalmente 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<sup>100</sup>. 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 en los sujetos que mantienen una dosis estándar<sup>104</sup>. Por otra parte, el genotipo del FVII y el polimorfismo de la protrombina 20210A pueden justificar pequeñas variaciones diarias del INR (índice normalizado internacional) entre enfermos tratados con acenocumarol<sup>105</sup>.

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 este cambio genético podría tener en la eficacia del tratamiento con diferentes drogas antiagregantes. Así, los portadores de la variante Pro33 se ha sugerido que podrían ser resistentes a la acción antitrombótica de la aspirina<sup>106</sup>; los anticuerpos monoclonales contra la GPIIb/IIIa, de gran uso en el intervencionismo coronario, tendrían una menor eficacia; y la posibilidad de modificar el efecto de las estatinas<sup>107,108</sup>.

La trombólisis 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. Hemos sugerido que la efectividad fibrinolítica guarde relación con las características de la fibrina del trombo, hecho vinculado a la presencia del polimorfismo del FXIII Val34Leu<sup>109</sup>.

En definitiva, el conocimiento de las interacciones génicas del sistema hemostático y su aplicación en el área de la farmacogenética, será una importante ayuda para la mejora de recursos y posibilidades terapéuticas.

#### **Patología del sistema hemostático como enfermedad conformacional**

La genómica y proteómica muestran la clara dicotomía entre el número de genes y el de proteínas funcionales. Nuestro genoma alberga unos 35.000 genes, cantidad que solamente justifica la existencia de un número similar de proteínas<sup>110</sup>. Sin embargo, se han descrito muchas más proteínas que genes. La explicación de esta aparente contradicción es que las proteínas sintetizadas pueden sufrir modificaciones en el proceso cotranslacional y postranslacional, momento crucial en la formación de estructuras proteicas funcionalmente activas. Los procesos de sulfatación, fosforilación, farnesilación, hidroxilación, metilación, glucosilación, hidrólisis, etc., explican la heterogeneidad proteica<sup>111</sup>.

La mutación FV-Ile3559Thr -FV Liverpool- crea un lugar potencial de glucosilación que podría modificar la secreción y/o interacción de la molécula con otras proteínas<sup>31</sup>. Es conocido que mutaciones "sin sentido" que afectan la región *shutter* de las serpinas tienen efectos conformacionales que dan lugar a la formación de oligómeros, con trastornos de secreción celular y pérdida de función. Este hecho ha sido observado en la antitrombina<sup>113</sup>, y se ha sugerido que esas moléculas modificadas y circulantes en el plasma podrían tener nuevas e indefinidas propiedades protrombóticas, exacerbadas por situaciones dispares de estrés ambiental como la hipertermia y embarazo<sup>113</sup>. Experimentalmente se han demostrado cambios notables en la molécula de antitrombina al someterla a calor, hecho que modifica sus propiedades funcionales<sup>114</sup>. Recientemente se ha identificado una mutación que condiciona un cambio conformacional del cofactor II de heparina, apareciendo fenotípicamente como la primera deficiencia homocigota<sup>115</sup>. Un cambio similar había sido descrito en otra serpina con un alto grado de homología, la  $\alpha_1$ -antitripsina, que ocasiona un defecto grave de su plegamiento proteico y da lugar a una acumulación de polímeros intracelulares, incapaces de ser segregados<sup>116</sup>.

Estas interesantes observaciones, junto con otras, abren nuevas perspectivas en el estudio de la enfermedad tromboembólica, al considerarla en determinados casos como una enfermedad conformacional<sup>117,118</sup>. Con los datos ya existentes será de interés evaluar el papel de mutaciones y factores ambientales sobre proteínas que forman parte de la familia de las serpinas y que desempeñan un papel relevante en el sistema hemostático, como el PAI-1, PAI-2 y  $\alpha_2$ -antiplasmina.

#### **Fase de integración**

Aunque se han conseguido notables avances en el conocimiento del sistema hemostático, todavía estamos lejos de una comprensión global e integral del mismo. Para alcanzarla necesitaremos profundizar al menos en los siguientes aspectos:

1. Conseguir una adecuada caracterización y un mejor conocimiento de los mecanismos bioquímicos que regulan las interacciones enzimáticas y celulares.
2. Obtener una mejor identificación y tipificación de las variedades genéticas implicadas en el sistema hemostático, así como conocer detalles de la interacción gen-gen y gen-factores ambientales.
3. El desarrollo aplicado de la farmacogenética.
4. Incorporar nueva metodología aportada por la proteómica.
5. Contar con adecuados y amplios estudios de epidemiología clínica y molecular.

Además, y de forma simultánea, se debe ir aclarando el papel que tiene el sistema hemostático en la respuesta inmune, activación del complemento, sistema inflamatorio, y en la proliferación, diferenciación y crecimiento celular. En definitiva, tal como indica el título de este trabajo, el equilibrio hemostático es un buen ejemplo de un complejo y dinámico sistema biológico.

#### **Agradecimientos**

A los doctores J. Corral y J. Rivera por la revisión crítica del manuscrito. Este trabajo ha sido realizado con la ayuda del Proyecto SAF2003-00840, del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

#### **Bibliografía**

1. Owen CA. A History of blood coagulation. En: Nichols WL, Bowie EJW, editors. Mayo Foundation for Medical Education and Research. Rochester: Minnesota, 2001.
2. Mannucci PM, Poller L. Venous thrombosis and anticoagulant therapy. *Br J Haematol* 2001;114:258-70.
3. Reddy KS. Cardiovascular disease in non-western countries. *N Engl J Med* 2004;350:2438-40.
4. Aird WC. Hemostasis and irreducible complexity. *J Thromb Haemost* 2003;1:227-30.
5. Wang L, Ho B, Ding JL. Transcriptional regulation of Limulus factor C: repression of an NFB lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2003;278:49428-37.
6. Doolittle RF. The evolution of vertebrate blood coagulation, a case of Yin and Yang. *Thromb Haemost* 1993;70:24-8.
7. Schmidt A. Zur Blutlehre. Leipzig: FCW Vogel, 1892.
8. Furlan M. Sticky and promiscuous plasma proteins maintain the equilibrium between bleeding and thrombosis. *Swiss Med Wkly* 2002;132:181-9.
9. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost* 2003;1:1504-14.
10. Butenas S, Branda RF, Van'tVeer C, Cawthern KM, Mann KG. Platelets and fosfolipids in tissue factor-initiated thrombin generation. *Thromb Haemost* 2001;86:660-7.
11. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965;13:516-30.
12. Griffin JH, Evtatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981;68:1370-3.
13. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1984;74:2082-8.
14. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002;8:1227-34.

15. White GC. The partial thromboplastin time: defining an era in coagulation. *J Thromb Haemost* 2003;1:2267-70.
16. Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, et al. Haemostatic function and ischaemic heart: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 1986;2:533-7.
17. Folsom AR. Hemostatic risk factors for atherothrombotic disease: An epidemiologic view. *Thromb Haemost* 2001;86:366-73.
18. Lavigne G, Mercier E, Queré I, Dauza M, Gris C. Thrombophilic families with inheritable associated high levels of coagulation factor VIII, IX and XI. *J Thromb Haemost* 2003;1:2134-9.
19. Samama MM, Dhal OE, Quinlan DJ, Mismetti P, Rosencher N. Quantification of risk factors for venous thromboembolism: a preliminary study for the development of a risk assessment tool. *Haematologica* 2003;88:1410-21.
20. Legnani C, Cosmo B, Cini M, Frascaro M, Guazzaloca G, Palareti G. High plasma levels of factor VIII and risk of recurrence of venous thromboembolism. *Br J Haematol* 2004;124:504-10.
21. Sramek A, Kriek M, Rosendaal FR. Decreased mortality of ischaemic heart disease among carriers of haemophilia. *Lancet* 2003;362:351-4.
22. Rosendaal FR, Van Hylckama Vlieg A, Tanis BC, Helmerhorst FM. Estrogens, progestogens and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2003;1:1371-80.
23. Hermida RC, Calvo A, Ayala DE, López JE, Fernández JR, Mojón A, et al. Seasonal variation of fibrinogen in dipper and nondipper hypertensive patients. *Circulation* 2003;108:1101-6.
24. Vicente V, Lozano ML, Rivera J, González-Conejero R, Corral J. Bases moleculares de las diátesis hemorrágicas congénitas y estados de trombofilia primaria. En: González de Buitrago JM, Medina Jiménez JM, editores. *Patología Molecular*. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana. 2001; p. 193-216.
25. Romeo G, Hassan HJ, Staempfli S, Roncuzzi L, Cianetti L, Leonardi A, et al. Hereditary thrombophilia: Identification of nonsense and missense mutations in the protein C gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2829-32.
26. Ware J, Russell S, Vicente V, Scharf RE, Tomer A, McMillan R, Ruggeri ZM. Nonsense mutation in the glycoprotein Iba coding sequence associated with Bernard-Soulier syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2026-30.
27. Arias-Salgado EG, Tao J, González-Manchón C, Butta N, Vicente V, Ayuso M, Parrilla R. Nonsense mutation in exon-19 of GPIIb associated with thrombasthenic phenotype. Failure of GPIIb (597-1008) to form stable complexes with GPIIIa. *Thromb Haemost* 2002;87:684-91.
28. González-Conejero R, Rivera J, Escolar G, Zuazu I, Vicente, Corral J. Molecular, ultrastructural and functional characterization of a Spanish family with Hermansky-Pudlak syndrome: role of insC974 in platelet function and clinical relevance. *Br J Haematol* 2003;123:132-8.
29. Burke W. Genomics as a probe for disease biology. *N Engl J Med* 2003;349:969-74.
30. Hamano A, Mimuro J, Aoshima M, Takeyoshi I, Kitamura N, Nishinara S, et al. Thrombophilic dysfibrinogen Tokyo V with the amino acid substitution of  $\gamma$  Ala327Thr: formation of fragile but fibrinolytic-resistant fibrin clots and its relevance to arterial thromboembolism. *Blood* 2004;103:3045-50.
31. Steen M, Norstrom H, Tholander AL, Bolton-Maggs PHB, Mumford A, McVey JH, et al. Functional characterization of factor V-Ile359Thr: a novel mutation associated with thrombosis. *Blood* 2004;103:3381-7.
32. Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 2003;361:598-604.
33. Souto JC. Genetic studies in complex disease: the case prolinkage studies. *J Thromb Haemost* 2003;1:1676-8.
34. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. 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* 1993;90:1004-8.
35. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;88:3698-703.
36. Bernardi F, Arcieri P, Bertina RM, Chiarotti F, Corral J, Pinotti M, et al. Contribution of Factor VII genotype to activated FVII levels. Differences in genotype frequencies between northern and southern European populations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2548-53.
37. Grant PJ. The genetics of atherothrombotic disorders: a clinician's view. *J Thromb Haemost* 2003;1:1381-90.
38. González-Conejero R, Corral J, Lozano ML, Rivera J, Moraleda JM, Vicente V. Polymorphisms of platelet glycoprotein Iba associated with arterial thrombotic disease. *Blood* 1998;92:2771-6.
39. Corral J, González-Conejero R, Vicente V. Genetic determinants of platelet function in thromboembolic diseases. *J Biol Reg Homeos [en prensa]*.
40. Corral J, González-Conejero R, Rivera J, Ortuño F, Aparicio P, Vicente V. Role of the 807 C/T polymorphism of the  $\alpha$ 2 gene in platelet GPIa collagen receptor expression and function: effect in thromboembolic diseases. *Thromb Haemost* 1999;81:951-6.
41. Corral J, Rivera J, González-Conejero R, Vicente V. The platelet GPIa receptor density associates with the genetically linked 807 C/T and HPA-5 polymorphisms. *Transfusion* 1999;39:372-8.
42. Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* 2001;344:1222-31.
43. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 2000;95:1517-32.
44. González-Conejero R, Corral J, Roldán V, Martínez C, Marín F, Rivera F, et al. A common polymorphism in the annexin V Kozak sequence (-1C > T) increases translation efficiency and plasma levels of annexin V, and decreases the risk of myocardial infarction in young patients. *Blood* 2002;100:2081-6.
45. Lozano ML, González-Conejero R, Corral J, Rivera J, Iniesta JA, Martínez C, et al. Polymorphisms of P-selectin glycoprotein ligand-1 are associated with neutrophil-platelet adhesion and with ischaemic cerebrovascular disease. *Br J Haematol* 2001;115:969-76.
46. Roldán V, González-Conejero R, Marín F, Pineda J, Vicente V, Corral J. Short alleles of P-selectin glycoprotein ligand-1 protect against premature myocardial infarction. *Am Heart J [en prensa]*.
47. Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze MW, et al. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Gen* 2001;28:389-92.
48. Almasly L. The complex hunt for genes influencing complex disease. *J Thromb Haemost* 2004;2:866-7.
49. Rosendaal FR. Genetic studies in complex disease: the case pro association studies. *J Thromb Haemost* 2003;1:1679-80.
50. Souto JC, Almasly L, Borrell M, Garí M, Martínez E, Mateo J, et al. Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families. *Circulation* 2000;101:1546-51.
51. Buil A, Soria JM, Souto JC, Almasly L, Lathrop M, Blangero J, et al. Protein C levels are regulated by a quantitative trait locus on chromosome 16. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1321-5.
52. Soria JM, Almasly L, Souto JC, Buil A, Martínez E, Mateo J, et al. A new locus of chromosome 18 that influences normal variation in activated protein C resistance phenotype and factor VIII activity and its relation to thrombosis susceptibility. *Blood* 2003;101:163-7.
53. Tirado I, Soria JM, Mateo J, Oliver A, Souto JC, Santamaría A, et al. Association after linkage analysis indicate that homozygosity for the 46C-T polymorphism in the F12 gene is a genetic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2004;91:899-904.
54. Freeman MS, Mansfield MW, Barrett JH, Grant PJ. Genetic contribution to circulating levels of hemostatic factors in healthy families with effects of known genetic polymorphisms on heritability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:506-10.
55. Heit JA, Phelps MA, Ward SA, Slusser JP, Petterson TM, De Andrade M. Familial segregation of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2004;2:731-6.
56. Vossen CY, Hasstedt SJ, Rosendaal FR, Callas PW, Bauer KA, Broze GJ, et al. Heritability of plasma concentrations of clotting factors and measures of a prethrombotic state in a protein C-deficient family. *J Thromb Haemost* 2004;2:242-7.
57. Hasstedt SJ, Scott BT, Callas PW, Vossen CY, Rosendaal FR, Long GL, et al. Genome scan of venous thrombosis in a pedigree with protein C deficiency. *J Thromb Haemost [en prensa]*.
58. Blangero J, Williams JT, Almasly L. Novel family-based approaches to genetic risk in thrombosis. *J Thromb Haemost* 2003;1:1391-7.
59. Hockin MF, Jones KC, Everse SJ, Mann KG. A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 2002;277:1832-3.
60. Butenas S, Vant't Veer C, Mann KG. "Normal" thrombin generation. *Blood* 1999;94:2169-78.
61. Kerlin B, Cooley BC, Isermann B, Hernández I, Sood R, Zogg M, et al. Cause-effect relation between hyperfibrinogenemia and vascular disease. *Blood* 2004; 103:1728-34.
62. Van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR. High levels of fibrinogen are associated with the risk of deep venous thrombosis mainly in the elderly. *J Thromb Haemost* 2003;1:2677-8.
63. Eitzman DT, Westrick RJ, Bi X, Manning SL, Wilkinson JE, Broze GJ, et al. Lethal perinatal thrombosis in mice resulting from the interaction of tissue factor pathway inhibitor deficiency and factor V Leiden. *Circulation* 2002;105:2139-42.
64. Kyrle PA, Mannhalter C, Beguin S. Clinical studies and thrombin generation in patients homozygous and heterozygous for the G20210A mutation in the prothrombin gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1287-91.
65. Colucci M, Binetti BM, Tripodo A, Chantarangkul V, Semeraro N. Hyperprothrombinemia associated with prothrombin G20210A mutation inhibits plasma fibrinolysis through a TAFI-mediated mechanism. *Blood* 2004;103:2157-61.
66. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood* 2003;101:20-30.
67. Cheresch DA, Berliner SA, Vicente V, Ruggeri ZM. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell* 1989;58:945-53.
68. De Marco L, Mazzucato M, Fabris F, De Roia D, Coser P, Girolami A, et al. Variant Bernard-Soulier syndrome type Bolzano. A congenital bleeding disorders due to a structural and functional abnormality of the platelet glycoprotein Iba-IX complex. *J Clin Invest* 1990;86:25-31.
69. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003;1:1335-42.
70. Ruggeri ZM. Type IIB von Willebrand disease: a paradox explains how von Willebrand factor works. *J Thromb Haemost* 2004;2:2-6.
71. O'Brien LA, Sutherland JJ, Hegadorn C, Benford K, Racz H, Rapson D, et al. A novel type 2A (Group II) von Willebrand disease mutation (L1503Q) associated with loss of the highest molecular weight von Willebrand factor multimers. *J Thromb Haemost* 2004;2:1135-42.

72. Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 2002;347:589-600.
73. Studt JD, Kremer JK, Radonic R, Gasparovic V, Ivanovic D, Merkler M, et al. Familial acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: ADAMTS 13 inhibitory autoantibodies in identical twins. *Blood* 2004;103:4195-7.
74. Bowen DJ, Collins PW. An amino acid polymorphism in von Willebrand factor correlates with increased susceptibility to proteolysis by ADAMTS-13. *Blood* 2004;103:941-7.
75. Corral J, Zuazu I, Rivera J, González-Conejero R, Ferrer F, Vicente V. Clinical and analytical relevance of the combination of prothrombin 20210A/A and factor V Leiden: results from a large family. *Br J Haematol* 1999;105:560-3.
76. Van Boven HH, Vandenbroucke JP, Briët E, Rosendaal FR. Gene-gene and gene-environment interactions determine risk of thrombosis in families with inherited antithrombin deficiency. *Blood* 1999;94:2590-4.
77. Faioni E, Castaman Asti D, Lussana F, Rodhehiero F. Association of factor V deficiency with factor V HR2. *Haematologica* 2004;89:195-200.
78. Carew JA, Basso F, Miller GJ, Hawe E, Jackson AA, Humphries SE, et al. 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* 2003;1:2179-85.
79. Butt C, Zheng H, Randell E, Robb D, Parfrey P, Xie YG. Combined carrier status of prothrombin 20210A and Factor XIII-A Leu34 alleles as a strong risk factor for myocardial infarction: evidence of a gene-gene interaction. *Blood* 2003;101:3037-41.
80. Roldán V, González-Conejero R, Marín F, Pineda J, del Rey ML, Sogorb F, et al. Synergism between functional hemostatic polymorphisms and risk of premature myocardial infarction. *Haematologica* [en prensa].
81. Dargaud Y, Meunier S, Negrier C. Haemophilia and Thrombophilia: an unexpected association! *Haemophilia* 2004;10:319-26.
82. Tizzano EF, Cornet M, Doménech M, Bajget M. Modifier genes in hemophilia: their expansion in the human genome. *Haemophilia* 2002;8:250-4.
83. Castoli E, Govers-Riemslog JWP, Pinotti M, Bindini D, Tans G, Berretini M, et al. Coinheritance of factor V (FV) Leiden enhances thrombin formation and is associated with a mild bleeding phenotype in patients homozygous for the FVII19726 + 5G > A (FVII Lazio) mutation. *Blood* 2003;102:4014-20.
84. Kunicki TJ. The influence of platelet collagen receptor polymorphisms in hemostasis and thrombosis diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:14-20.
85. Donahue BS, Gailani D, Higgins MS, Drinkwater DC, George AL. Factor V Leiden protects against blood loss and transfusion after cardiac surgery. *Circulation* 2003;107:1003-8.
86. Lindquist PG, Svenson PJ, Dahlback B, Marsal K. Factor V Q506 mutation (activated protein C resistance) associated with reduced intrapartum blood loss—a possible evolutionary selection mechanism. *Thromb Haemost* 1998;79:69-73.
87. Lindquist PG, Zoller B, Dahlback B. Improved hemoglobin status and reduced menstrual blood loss among female carriers of FV Leiden—a evolutionary advantage? *Thromb Haemost* 2001;86:1122-3.
88. Gopel W, Gortner L, Colman T, Shultz C, Moller J. Low prevalence of large intraventricular haemorrhage in very low birthweight infants carrying the factor V Leiden or prothrombin G20210A mutation. *Acta Paediatr* 2001;90:1021-4.
89. Iniesta JA, González-Conejero R, Piqueras C, Vicente V, Corral J. The platelet GPIIb polymorphism HPA-1 (PIA1) protects against subarachnoid haemorrhage. *Stroke* [en prensa].
90. Hammar N, Kaprio J, Hagstrom U, Alfredsson L, Koskenvuo M, Hammar T. Migration and mortality, a 20 year follow-up of Finnish twin pairs with migrant co-twins in Sweden. *J Epidemiol Comm Health* 2002;56:362-6.
91. Kemmeren JM, Algra A, Meijers JC, Trans G, Bouma BN, Curvens J, et al. Effect of second-and third-generation oral contraceptives on the protein C system in the absence or presence of the factor V Leiden mutation: a randomized trial. *Blood* 2004;103: 927-33.
92. Mariani G, Conard J, Bernardo F, Bertina R, Vicente V, Prydz H, et al. Oral contraceptives highlight the genotype-specific association between serum phospholipids and activated factor FVII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2024-8.
93. Mariani G, Bernardi F, Bertina R, Vicente V, Prydz H, Samama M, et al. Serum phospholipids are the main environmental determinants of activated factor VII in the most common FVII genotype. *Haematologica* 1999;84:620-6.
94. Iacovello L, Di Castelnuovo A, D'Orazio A, Donati MB. Cigarette smoking doubles the risk of myocardial infarction in carriers of a protective polymorphism in the blood coagulation Factor VIII gene. *Thromb Haemost* 1999;81:658.
95. Roldán V, Corral J, Marín F, Pineda J, Vicente V, González-Conejero R. A synergistic association between hypercholesterolemia and a common C46T polymorphism in the Kozak region of factor XII for developing premature myocardial infarction. *Am J Cardiol* [en prensa].
96. Legnani C, Cini M, Cosmi B, Mattarozzi S, Lo Manto G, Palaretti G. Oral contraceptive use in women with poor anticoagulant response to activated protein C but not carrying the factor V Leiden mutation increases the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2004;91:712-8.
97. Martinelli I, Legnani C, Buchiarielli P, Grandone E, De Stefano V, Mannucci PM. Risk of pregnancy-related venous thrombosis in carriers of severe inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* 2001;86:800-3.
98. Ehrenforth S, Nemes L, Mannhalter C, Rosendaal FR, Koder S, Zoghalmi-Rintelen C, et al. Impact of environmental and hereditary risk factors on the clinical manifestation of thrombophilia in homozygous carriers of factor V:G1691A. *J Thromb Haemost* 2004; 2:430-6.
99. Dunn EJ, Ariens RA, De Lange M, Snieder H, Turney JH, Spector TD, et al. Genetics of fibrin clot structure: a twin study. *Blood* 2004; 103:1735-40.
100. Phillips KA, Veentra DL, Owen E, Lee JK, Sadee W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse reactions: a systematic review. *JAMA* 2001;286:2270-9.
101. Evans WE, Johnson JA. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Ann Rev Genom Hum Genet* 2001;2:9-39.
102. Tanis BC, Blom HJ, Bloemenkam DGM, Van den Bosch MAA, Algra A, Van der Graaf Y, et al. 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* 2004;2:35-41.
103. Fohr IP, Prinz R, Bronstrup A, Bohlmann AM, Nau H, Berthold HK. 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* 2002;75:275-82.
104. Hermdia J, Zarza J, Alberca I, Montes R, López ML, Molina E, et al. Differential effects of 2C9\*3 and 2C9\*2 variants of cytochrome P-450 CYP2C9 on sensitivity to acenocumamol. *Blood* 2002;99: 4237-9.
105. Rodán V, Corral J, Sánchez-Payá J, Vicente V, González-Conejero R. Pharmacogenetic effect of factor VII -323 Del/Ins polymorphism on diurnal variation of FVIIc and INR in steady anticoagulated patients with acenocumamol. *J Thromb Haemost* [en prensa].
106. Cooke GE, Bray PF, Hamlington JD, Pham DM, Goldschmidt-Clermont PJ. PLA-2 polymorphism and efficacy of aspirin. *Lancet* 1998; 351:1253.
107. Walter DH, Schachinger V, Elsner M, Mach S, Dimmeler S, Auchschwel W. 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* 2001;22:587-95.
108. Wheeler GL, Braden GA, Bray PF, Marciniak SJ, Macelli MA, Sane DC. Reduced inhibition by abciximab in platelets with the PLA-2 polymorphism. *Am Heart J* 2002;143:76-82.
109. Roldán V, Corral J, Marín F, Rivera J, Vicente V. Effect of Factor XIII Val34Leu polymorphism on thrombolytic therapy in premature myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2002;88:354-5.
110. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature* 2003;422:193-7.
111. Cristea IM, Gaskell SJ, Whetton AD. Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood* 2004;103:3624-34.
112. Han KK, Martinage A. Post-translational chemical modification(s) of proteins. *Int J Biochem* 1992;24:19-28.
113. Corral J, Huntington JA, González-Conejero R, Mushunje A, Navarro M, Marco P, et al. Mutations in the shutter region of antithrombin result in formation of disulfide-linked dimers and severe venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2004;2:931-9.
114. Corral J, Rivera J, Martínez C, González-Conejero R, Miñano A, Vicente V. Detection of conformational transformation of antithrombin in blood by crossed immunoelectrophoresis: New application for a classical method. Effect of temperature in plasmatc antithrombin, role in senescence of antithrombin and thrombosis. *J Lab Clin Med* 2003;142:298-315.
115. Corral J, Aznar J, González-Conejero R, Villa P, Miñano A, Vayá A, et al. Homozygous (Glu428Lys) type I deficiency of heparin cofactor II. Relevance of P17 residue in serpins and relationship with conformational diseases. *Circulation* [en prensa].
116. Carrell RW, Lomas DA. Alpha1-antitrypsin deficiency. A model for conformational diseases. *N Engl J Med* 2002;346:45-53.
117. Carrell RW, Huntington JA, Mushunje A, Zhou A. The conformational basis of thrombosis. *Thromb Haemost* 2001;86:14-22.
118. Carrell RW, Corral J. What can Drosophila tell us about serpins, thrombosis and dementia? *Bioassays* 2004;26:1-5.