

Bases genéticas de la enfermedad tromboembólica venosa

AJ González-Ordóñez

Resumen

La trombofilia hereditaria como predisposición genética a desarrollar la enfermedad tromboembólica venosa es una entidad heterogénea. La prevalencia conjunta de los trastornos graves como serían los déficits de inhibidores naturales de la coagulación (antitrombina III, proteína C y proteína S) es bastante menor del 1%. Por el contrario, dos polimorfismos recientemente descritos, asociados a una menor expresividad clínica (factor V Leiden y protrombina G20210A) alcanzan una prevalencia conjunta de 5-10% en sujetos caucásicos. La combinación de alelos trombofílicos (dobles heterocigotos u homocigotos para factor V Leiden) también produce fenotipos de alto riesgo y precisa un régimen especial de profilaxis antitrombótica. Además, otras variaciones genéticas (haplotipo HR2, mutaciones de trombomodulina) o anomalías genéticamente condicionadas (concentraciones altas de fibrinógeno, factores VIII, IX y XI, inhibidor del activador de plasminógeno y homocisteína) se asocian a enfermedad tromboembólica venosa en los estudios epidemiológicos. Por el contrario, la variante termolábil de metilentetrahidrofolato reductasa supone un riesgo menor y es de una utilidad discutible en la evaluación de la hipercoagulabilidad.

Muchas de estas variables genéticas se han incorporado al estudio rutinario de trombofilia a través de métodos funcionales provocando su estricta dependencia de algunas circunstancias ambientales que deben ser identificadas (como el momento evolutivo óptimo para su investigación).

Otras variaciones genéticas y reguladores de la transcripción que influirán en la enfermedad tromboembólica venosa (por interacciones gen-gen y gen-ambiente) permanecen sin descubrir.

Palabras clave: Factores de riesgo genéticos, polimorfismos, trombofilia, trombosis venosa, embolismo pulmonar.

Summary. Genetic determinants of the venous thromboembolism

Inherited thrombophilia, considered as a genetically-determined increased predisposition to venous thromboembolism, is an heterogeneous clinical entity. In overall, dominant defects such as deficiencies of natural coagulation inhibitors (antithrombin III, protein C or protein S) show prevalence below 1% of the population. In contrast, two recently described polymorphisms involved in milder clinical manifestations (factor V Leiden or prothrombin G20210A) reach an overall prevalence between 5-10% among Caucasians. However, the frequent combination of thrombophilic traits (double heterozygotes or factor V Leiden homozygotes) also produces a high thrombotic risk phenotype and deserves special consideration for antithrombotic prophylaxis. Furthermore, other genetic variations (HR2 haplotype, thrombomodulin mutations) and defects of probably genetic origin (increased levels of fibrinogen, factors VIII, IX and XI, plasminogen activator inhibitor-1 or homocysteine) seem associated with the venous thromboembolism in epidemiological studies. By contrary, the risk related with the thermolabile variant of methylene tetrahydrofolate reductase seems to be low and several experts argue against this specific testing during the thrombophilia study.

Several genetic variations have been incorporated to the clinical assessment of hypercoagulability through functional methods, being strongly dependent of some environmental circumstances (such as the optimal time for sampling) that must be identified.

According to a multicausal model, many other unknown genetic variations and transcriptional regulators could contribute by means of gene-gene and gene-environment interactions to the complex genetic origins of the venous thromboembolism.

Keywords: Genetic risk factors, polymorphisms, thrombophilia, venous thrombosis, pulmonary embolism.

INTRODUCCIÓN

La importancia clínica de la oclusión trombótica del territorio venoso deriva de su alta incidencia (superior a 1/1000 anual) y severidad (tercera causa de muerte súbita)(1) tanto como de las dificultades para establecer un diagnóstico específico por métodos incruentos. La localización anatómica afectada condiciona la gravedad del cuadro que puede oscilar desde la tromboflebitis superficial al embolismo pulmonar mortal. Su presentación habitual se asocia con el origen del trombo en venas internas de los miembros o con su migración a ramas segmentarias de la circulación pulmonar, condicionando trombosis venosas profundas y embolias pulmonares no mortales, respectivamente. Pero la importancia clínica de la enfermedad

tromboembólica venosa procede también de la magnitud de sus secuelas (síndrome posttrombótico e hipertensión pulmonar) y de la severidad de las llamadas *trombosis viscerales*: una amplia gama de cuadros clínicos abigarrados relacionados con la trombosis de venas renales, cerebrales, mesentéricas, suprahepáticas o del territorio porto-esplénico. Además, su conocida tendencia a recidivar (como mínimo un 30% a los 10 años si se efectuó un tratamiento inicial correcto) (1), convierte a la enfermedad tromboembólica venosa en una auténtica enfermedad crónica o recurrente (2).

Intentar comprender la enfermedad tromboembólica venosa se está convirtiendo en una tarea infinitamente más ardua de lo que cabía suponer. En su origen aparecen complejas interacciones entre factores de riesgo genéticos y adquiridos. La mayoría de los factores de riesgo genéticos y algunos de los adquiridos (neoplasias, estrógenos, gestación-parto-puerperio, anticoagulante lúpico) producen cambios en la composición

de la sangre tendentes a su hipercoagulabilidad. Por el contrario, los factores adquiridos típicos implican un descenso del flujo circulatorio (edad avanzada, inmovilidad, cirugía, vendaje, gestación) o un cierto grado de lesión vascular (traumatismo, cirugía ortopédica, trombosis previa). La importancia de los factores genéticos radicaría en su persistencia (al menos teóricamente actuarían durante toda la vida), sin embargo rara vez su influencia alcanza a desencadenar una oclusión vascular independiente de la edad (considerada como el factor ambiental más relevante).

En un sentido amplio el concepto de *trombofilia* debería definir la predisposición a desarrollar episodios trombóticos independientemente de su localización arterial o venosa. Sin embargo, en nuestro medio se emplea más como una categoría de la enfermedad tromboembólica venosa aplicada a los pacientes que la sufren con especial frecuencia o severidad (tendencia familiar, debut juvenil, presentación espontánea, localización inusual o tendencia a la recurrencia).

Este concepto se opone al de *hemostasia fisiológica* que genera coágulos únicamente donde se precisan (herida-sección vascular), sin adquirir nunca un tamaño excesivo y persistiendo solo el tiempo necesario. Filogénicamente supone un número mínimo/ óptimo de trombosis y hemorragias en los sistemas circulatorios más evolucionados. Clínicamente conlleva la formación de coágulos de fibrina estables pero no invasivos, de acuerdo a un doble equilibrio secuencial: inicialmente entre procoagulantes (plaquetas y factores de coagulación) y anticoagulantes naturales y posteriormente, entre profibrinolíticos y antifibrinolíticos. Así pues, la diátesis trombótica aparece por aumento de procoagulantes o antifibrinolíticos o por defecto de anticoagulantes o profibrinolíticos.

VARIACIÓN GENÉTICA

Los desequilibrios protrombóticos de origen genético aparecen por la existencia de mutaciones que originan una «hipofunción» (o déficit) en los anticoagulantes naturales (antitrombina, proteína C o proteína S) o por variantes genéticas que originan «hiperfunción» (como el aumento de protrombina, fibrinógeno o inhibidor del activador tisular de plasminógeno/PAI-1). En el primer caso, se reconocen múltiples tipos de lesiones genéticas diferentes (mutaciones, deleciones, etc) (3,4,5) afectando a una fracción muy escasa de población (siempre muy inferior al 1%, prácticamente mutaciones exclusivas de ese linaje). En el segundo, suele existir una diferencia puntual (idéntica en toda la población afectada), de alta prevalencia (generalmente superior al 1%, por lo que ya no se denominaría mutación sino *polimorfismo*).

Los polimorfismos más frecuentes son los llamados de nucleótido único (SNP o *single nucleotide polymorphism*) (figura 1), aunque también existen otros tipos: en algunos varía el número de repeticiones de una secuencia constante –*variable number of tandem repeats* o VNTR– y en otros un cierto segmento de DNA está o no presente (inserción/delección). Los polimorfismos de nucleótido único suelen ser dimorfismos (tener adenina en lugar de guanina en posición 1691 del gen del factor V, sustituye el alelo nativo 1691G por el alelo variante 1691A que origina el factor V Leiden), igual que las variantes que consisten en inserción o delección (el alelo delección carece de una secuencia presente en el alelo inserción). Por el contrario, las variaciones del número de repeticiones de una secuencia constante pueden no ser dimórficas sino más complejas cuando el gen puede incluir un



Figura 1 Tipos de polimorfismos genéticos más comunes. *SNP*: polimorfismo de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism*). *VNTR*: variación del número de repeticiones de una secuencia constante (*variable number of tandem repeats*); una variante serían los *STR* cuando estas secuencias son especialmente cortas (*short tandem repeats*). *In/del*: designa polimorfismos en los que cierto segmento de DNA está o no presente (inserción/delección).

número variable de copias de una determinada secuencia (originando por ejemplo alelos de 4 copias y alelos de 5, 6 o más copias).

Un polimorfismo localizado antes del punto de inicio de la transcripción o traslación (en el extremo 5' del gen), se describe con un signo negativo delante del número que indica la posición del nucleótido variable. Por el contrario, si ocurre en un exón se prefiere nombrarlo de acuerdo al cambio del aminoácido sufrido (consignando el número del codón modificado); así, el factor V Leiden resulta mejor definido como factor V Arg506Gln que como factor V G1691A. En la región 3' después del codón de parada, se numeran a partir de él. Los cambios en un intrón pueden llevar signo positivo (si se numeran desde el origen del intrón) o negativo (si se numeran hacia atrás desde el inicio del exón siguiente); así, las notaciones C+55/in6T y C-12/in6T podrían referirse al mismo polimorfismo de nucleótido único. Para polimorfismos de tamaño, podrían consignarse las notaciones ins/del o el número de repeticiones (*n rpt*).

VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS A LA ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA

La enfermedad tromboembólica venosa es un modelo de enfermedad multifactorial; se considera que aparecerá en un determinado individuo siempre que su potencial trombogénico sometido a una cierta situación clínica rebase el valor umbral (6). En el momento actual están bien caracterizados siete fac-

tores de riesgo de tipo genético (tabla I) que describiremos siguiendo el orden cronológico de su descubrimiento.

Déficit de antitrombina (AT/ATIII)

Esta conocida glicoproteína (de la familia de los inhibidores de serinproteasas o serpinas) es el principal inhibidor de la trombina (FIIa), con capacidad de neutralizar también a otros factores activados (FIXa, FXa, FXIa, FXIIa) (figura 2); la heparina y diversos heparinoides naturales amplificarían su efecto anticoagulante.

Su déficit fue descrito por primera vez en una familia noruega afectada de trombofilia (Egeber *et al.* 1965) (7). En 1993 se habían descrito ya 79 mutaciones en el gen de la antitrombina (3) que suelen transmitirse siguiendo un patrón autosómico dominante con heterocigotos potencialmente afectados (la ausencia de homocigotos se atribuye a su letalidad). Se distinguen dos tipos de déficit: tipo I si produce un descenso proporcional de toda la molécula (déficit de antitrombina inmunológica y funcional) y tipo II cuando la concentración de la proteína es fisiológica pero su actividad está reducida (variantes moleculares disfuncionantes). Afecta a menos de 1/1000 individuos sanos y apenas se observa en el 1% de pacientes no seleccionados (o consecutivos) con trombosis venosa (8), condicionando riesgos relativos próximos a 10. Aunque su penetrancia es incompleta numerosos portadores sufren enfermedad tromboembólica venosa juvenil (antes de los 30 años) y sin desencadenante aparente, si bien también abundan los relacionados con gestación y puerperio. La detección de este fen-

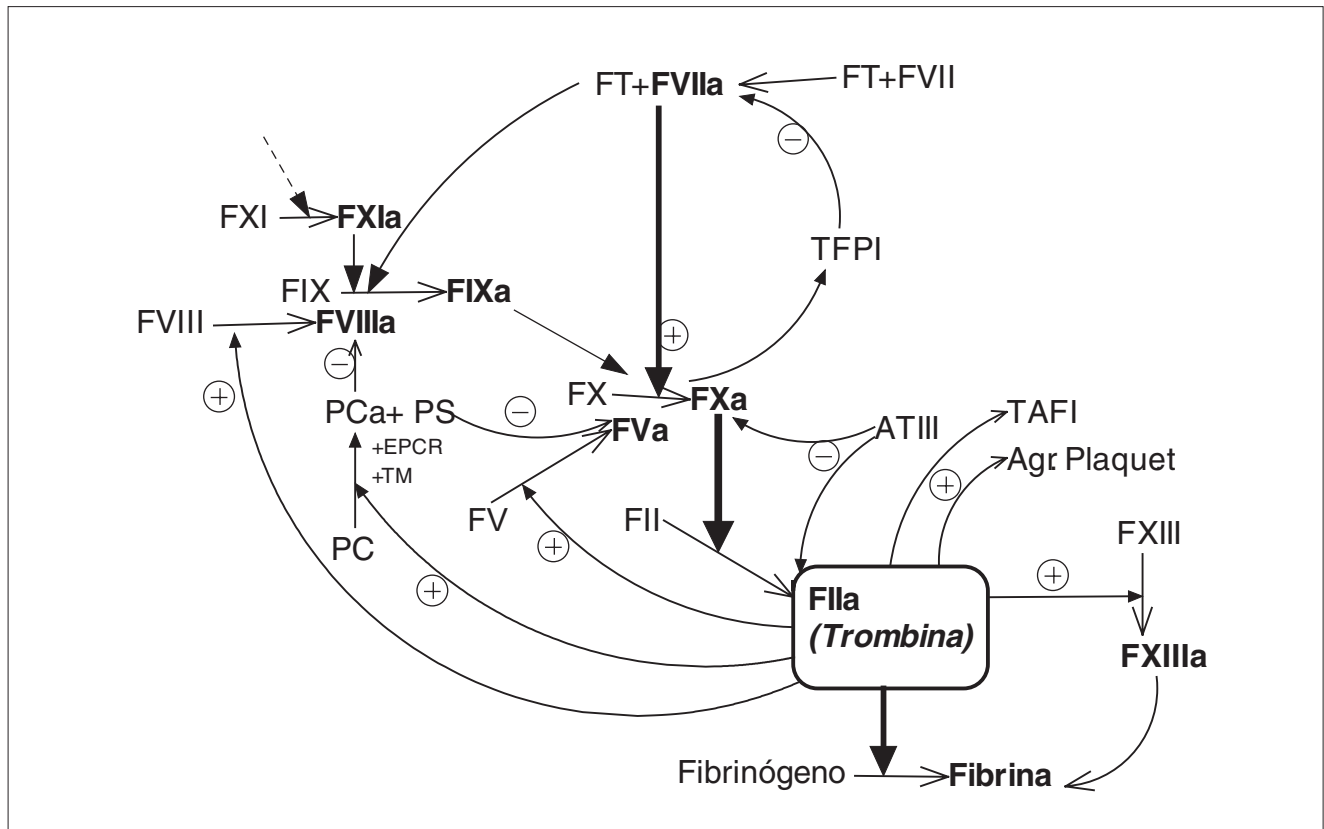


Figura 2 Representación esquemática de los mecanismos de coagulación. Se considera que la activación principal procede de la unión del FT (factor tisular) y del FVIIa (factor VII activo). Le siguen la activación de los factores IX (FIX) y X (FX) con la cooperación de los cofactores (FVIII: factor VIII y FV: factor V). Referido a cualquier factor «a» significa el mismo factor *activo*. FXI: factor XI, FII: factor II (protrombina), FXIII: factor XIII; PC: proteína C, PS: proteína S, EPCR: receptor endotelial de la PC, TM: trombomodulina, ATIII (antitrombina), TFPI («*tissue factor pathway inhibitor*»/inhibidor de la vía del FT), TAFI («*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*» / inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina).

Tabla I. Variantes genéticas causantes de trombofilia hereditaria bien caracterizadas

Anomalía	Prevalencia (%)		Odds Ratio	Edad debut (años)	Incidencia anual ETEV (%)
	en población general	TEV no seleccionado			
Déficit de AT	0,03-0,1	1	10	15-40	1-2
Disfibrinogenemia congénita	<0,01	0,1	(?)	Variable	(?)
Grupo sanguíneo no-O	50-60	70-75	2	Variable	(?)
Déficit de PC	0,2-0,5	3	8-10	25-35	1-2
Déficit de PS	0,5 (?)	2	2-5(?)	30-40 (?)	1-2
Factor V Leiden	Heterocigosis (>95%):	15-20	5-6	40-70	0,2
	Homocigosis < 0,1	1-5	40-80	30-50	0,5-1
Protrombina 20210 A	2-3	5-12	2-4	40-70	0,1-0,2
Factor V Leiden + Protrombina 20210A	0,05-0,1	2	20	35-50	0,5-1

ETEVEV: enfermedad tromboembólica venosa; TEV: tromboembolismo venoso; AT: Antitrombina; PC: Proteína C; PS: Proteína S. Las cifras de prevalencia se refieren a nuestro entorno étnico/ geográfico. La edad de la primera manifestación trombótica se consigna con carácter orientativo (en la práctica los pacientes asocian factores y antifactores de riesgo).

tipo en el laboratorio de hemostasia requiere métodos funcionales, generalmente amidolíticos.

Por supuesto que numerosas situaciones clínicas adquiridas (hepatopatía, estrógenos, síndrome nefrótico, heparinoterapia, coagulopatía de consumo) pueden reducir las concentraciones de antitrombina, pero no son el objeto de esta revisión.

Disfibrinogenemia congénita

Descrita también por Egeber en 1967 en asociación con trombosis (9). Actualmente se reconocen variantes moleculares de fibrinógeno (fibrinógeno New York I) (10) responsables de una interacción patológica entre trombina y fibrina que permiten la persistencia de trombina libre (no atrapada en el coágulo) como causa de fenómenos trombóticos. Otras anomalías en el gen del fibrinógeno originan aumento de la agregación de las plaquetas (fibrinógeno Oslo I) (11) o coágulos de fibrina especialmente resistentes a la acción lítica de la plasmina (fibrinógenos Chapel Hill II, III) (12) (figura 3). Sin embargo la mayoría de las disfibrinogenemias descritas en la literatura

curan de forma asintomática (o incluso con hemorragia), por lo que sería una de las causas más infrecuentes de enfermedad tromboembólica venosa (menor del 1% en la mayoría de las series). El estudio rutinario de trombofilia incluye un tiempo de trombina para intentar su detección. Se han descrito moléculas variantes con ambos patrones de transmisión (dominante y recesivo). Las disfibrinogenemias adquiridas (hepatopáticas) son bastante más frecuentes pero no suelen incrementar el riesgo trombótico.

Grupo sanguíneo no-O (gen de la galactosil-transferasa)

Poco tiempo después se publicó un estudio epidemiológico estableciendo que los grupos sanguíneos A, B y AB tienen un riesgo superior de problemas tromboembólicos (unas 2 veces) que los sujetos de grupo O (13). Los sujetos de grupos no-O presentan concentraciones superiores de factor von Willebrand (FvW), una glicoproteína multimérica que actúa como transportador del factor VIII coagulante (FVIIIc) e interviene en la adhesión de las plaquetas al subendotelio. Se asocia también a unas concentraciones plasmáticas superiores de factor VIII coagulante por reducción de su depuración (incremento de semivida) (14). Se trataría de un auténtico polimorfismo pues cualquiera de las cuatro versiones del fenotipo no se considera patológica (por su elevada frecuencia). Condiciona un tercio de la variabilidad total (de origen genético) observada en las concentraciones de estos dos factores (ya claramente establecidos como de riesgo en trombosis venosa) (15, 16). Afecta a un 50-60% de la población (sujetos no-O), que suponen –sin embargo– un 70-75% de los casos de tromboembolismo venoso no seleccionados (17).

Déficit de proteína C

La proteína C es un inhibidor vitamina K dependiente, de síntesis hepática que inactiva los factores Va y VIIIa si ha sido previamente activada (proteína C activada) y dispone de proteína S (figura 2).

Griffin *et al* describen (en 1981) el déficit de proteína C en varios miembros de una familia con trombosis de repetición (18). En 1995 ya se habían descrito en su gen (PROC), 160 mutaciones cursando con ambos tipos de déficit (I y II). Como el déficit de antitrombina, el de proteína C reconoce un patrón

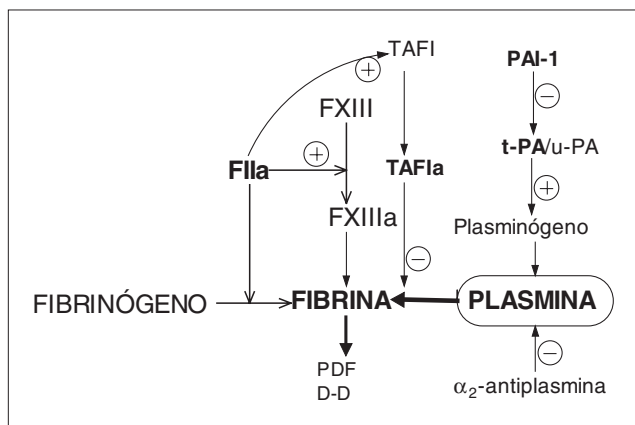


Figura 3 Representación esquemática de los mecanismos de fibrinólisis. TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina, t-PA: activador (tisular) del plasminógeno, u-PA: activador (tipo urinario) del plasminógeno, PAI-1: inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno, FIIa: trombina, FXIII: factor XIII (estabilizador de la fibrina). Factor a significa factor activo. PDF: productos de degradación de la fibrina, D-D: dímero D.

de transmisión autosómico dominante (heterocigotos expuestos) con penetrancia incompleta (adultos asintomáticos). Los homocigotos son viables pero sufren púrpura fulminante y trombosis venosas masivas ya en el período neonatal.

Con prevalencias de un portador por cada 200-500 donantes sanos y un 3% de pacientes con enfermedad tromboembólica venosa (no seleccionados) se le atribuye un riesgo relativo cercano a diez (8, 19). Probablemente coexiste con otro tipo de déficit clínicamente más expresivo pero menos frecuente. En la detección de este fenotipo se recomienda –también– un método funcional amidolítico.

Déficit de proteína S

La proteína S es otra proteína anticoagulante de función crítica. Cofactor no enzimático de la proteína C activada en la inactivación de FVa y FVIIIa (figura 2) se sintetiza en el hígado también en relación con la existencia de vitamina K.

En 1984 Comp *et al* describen dos casos emparentados asociados a trombosis venosa recurrente (20). Pronto se manifestó la complejidad del estudio de la proteína S en el laboratorio de hemostasia, dado que existe bajo dos formas: libre o activa como cofactor de proteína C activada (40%) y ligada, formando complejos con un transportador del complemento (C4b *binding protein* o C4bp) (el 60% restante). Para mayor confusión se describe en 1987 la existencia de un pseudogen (inactivo) en las proximidades del gen auténtico (PROS-1) que mostraba ya 131 mutaciones en la compilación del año 2000 (5). La mayor parte de los pacientes sufren déficits tipo I. El patrón hereditario es también autosómico dominante afectando a heterocigotos con penetrancia incompleta. Su expresividad es generalmente menor que la del déficit de proteína C aunque también se han descrito homocigotos con púrpura neonatal fulminante.

La prevalencia de este déficit –no bien conocida por razones técnicas– podría ser similar al de proteína C (además algunas variantes bastante prevalentes como la proteína S Heerlen no causarían trombofilia) y suele suponer el 2% en las series de casos consecutivos de enfermedad tromboembólica venosa (8) (más si seleccionáramos familias trombofílicas). Los métodos inmunológicos (preferentemente tipo enzimo-inmunoanálisis) para proteína S total y libre asocian máxima rentabilidad diagnóstica y mínimo de interferencias.

Resistencia a la proteína C activada de origen genético

a) Originada por el factor V Leiden (FVL)

Dahlbäck *et al* describen en 1993 tres pacientes trombóticos no emparentados (y algunos de sus familiares afectados) con un nuevo fenotipo: la reducción del poder anticoagulante de la proteína C activada (21). Esta resistencia afectaba a más pacientes de trombosis venosa que a sujetos sanos y podía evidenciarse en el laboratorio con pruebas coagulométricas basadas en el TTPA (registrando su alargamiento en forma de cociente al añadir la proteína C activada). En la población sueca este déficit resultó ser especialmente prevalente afectando al 5% de los sujetos sanos y al 20-25% de los sujetos con trombosis venosa al azar (superando el 50% si los pacientes eran seleccionados por pertenecer a familias con trombosis venosa) (tabla II).

Al año siguiente Bertina *et al* describen un alelo variante consistente en la sustitución de guanina por adenina (G→A) en el nucleótido 1691 (exón 10) que predice el cambio de la Arg506 por Gln en la molécula del factor V, presente en el 80-

90% de los sujetos con aquel fenotipo. A este FV G1691A (FV R506Q) se le denominó factor V Leiden (22) en reconocimiento a la ciudad que albergó los primeros estudios (la misma mutación fue referida por otros dos grupos de investigadores independientes en el plazo de dos meses). La anomalía molecular del factor V se localiza en un punto crítico para la inactivación del factor V activado por parte de la proteína C activada (permaneciendo más tiempo en su forma procoagulante) (23) (figura 2) y para su función de cofactor (de la proteína C activada y la proteína S) en la inactivación del factor VIII activado.

Históricamente, el factor V Leiden suscitó un excepcional interés por el estudio de la contribución genética al fenotipo trombótico. Era la primera vez que una anomalía única (con lo que supone de simplicidad analítica) tenía una presencia significativa en los estudios de trombofilia. Su estudio por medio de la reacción en cadena por la polimerasa se generalizó rápidamente permitiendo identificar ciertas sinergias. Hasta un 20% de las familias afectadas por un déficit de proteína C presentan también el factor V Leiden en estado heterocigoto (24). Potencia el déficit de proteína S, de modo que los dobles heterocigotos sufren una penetrancia superior al 70% (en lugar de la habitual del 20%) (25) lo que habría llevado a sobreestimar la importancia trombogénica del déficit de proteína S en las publicaciones previas.

Los sujetos portadores del factor V Leiden en estado heterocigoto (FV 1691GA) sufren un riesgo relativo de trombosis venosa entre 5 y 6, pudiendo llegar a ser de 80 entre los sujetos homocigotos (FV 1691AA) (26) (tabla I). Aunque se involucró en trombosis venosas cerebrales (27), parece causar más tromboflebitis (trombosis venosas superficiales) y trombosis venosas profundas que embolias pulmonares (28,29,30), lo que le hace compatible con una expectativa de vida normal (31). Se implica fuertemente en el riesgo de trombosis venosa que presentan las mujeres en los primeros meses de exposición a los estrógenos (píldora anticonceptiva) (32), especialmente en caso de homocigosis, aunque los análisis para su despistaje no se consideran aún costo-efectivos en esta indicación.

Está ausente en razas orientales y escasea en sujetos de origen no europeo (33).

b) Originada por factores genéticos diferentes del factor V Leiden

Otras variantes genéticas que pueden producir una resistencia a la proteína C activada, aunque con una frecuencia o intensidad inferior, serían:

– El llamado haplotipo HR2 del gen del factor V (incluye 6 sustituciones de bases puntuales en los exones 13 y 16), se hereda independientemente del factor V Leiden y está presente en el 8-10% de los sujetos libres de trombosis venosa en nuestro medio. Especialmente en forma homocigota puede producir un cierto grado de resistencia a la proteína C activada (34) (tabla III). Los dobles heterocigotos FVL/HR2 tienen mayor riesgo de trombosis venosa que los sujetos que solo presentan factor V Leiden.

– El muy infrecuente factor V Cambridge (Arg306→Thr) se describió en una familia afectada de trombosis y produce un cierto grado de resistencia a la proteína C activada (35), a diferencia de otras variantes como el llamado factor V Hong Kong (Arg306→Gly).

– La concurrencia en un mismo sujeto de un déficit de factor V con una variante factor V Leiden incrementaría el grado

Tabla II. Anomalías moleculares protrombóticas de origen combinado (genético + ambiental)

Anomalía	Condicionante		Prevalencia (%)		Odds Ratio
	Genético	Ambiental	Población general*	TEV no seleccionado	
Resistencia a PCa	Factor V Leiden Haplotipo HR2 (?) (Factor V Cambridge)	Estrógenos Gestación Incremento de Factor VIII Anticoag. Lúpico Dislipemia (?)	5	25	5
Hiperfibrinogenemia	-455 G/A (beta) (Otros)	Inflamación Gestación Edad	5-10	20 (?)	2-4 (?)
Incremento de Factor VIII (> 1,5 U/L)	Grupo ABO no-O FvW -1234 C/T FvW Thr789Ala (Otros)	Inflamación Gestación Edad	10	25-30	4-5
Incremento de Factor IX (P ₉₀)	Desconocido	Edad Estrógenos	10	20-25	2-3
Incremento de Factor XI (P ₉₀)	Desconocido	Edad	10	20	2-2,5
Incremento de PAI-1	-675 4G/4G	Hipertrigliceridemia Tabaquismo Obesidad- Edad	10-15	15-30	(1,5?)
Hiperhomocisteinemia > 18,5 mM > 15 mM (¿?)	MTHFR 677TT MTHFR A1298C CBS 68bp D/I	Folicopenia Insuficiencia Renal Tabaquismo Edad	5-10	10-25	2-3
Hiperprotrombinemia (>1,15 U/L)	FII 20210 A	Estrógenos/ Gestación	5	10-15	2-3

*las prevalencias del 10% se deben –en general- a que los correspondientes estudios han utilizado el P90 como valor umbral de comparación.
TEV: tromboembolismo venoso; PCa: Proteína C activa; PAI-1: inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno; FvW: Factor von Willebrand;
MTHFR: metilén tetrahidrofolato reductasa; CBS: cistationina beta-sintetasa.

de resistencia a la proteína C activada (seudohomocigosidad) y el riesgo trombótico (36).

Omitiremos deliberadamente todas las causas de resistencia a la proteína C activada adquiridas (elevación de factor VIII coagulante, estrógenos, gestación o anticoagulante lúpico) (tabla II) aún cuando pudieran tener algún componente genético y puedan suponer también un riesgo de trombosis venosa (e incluso arterial), por escapar al objetivo de esta revisión. En el estudio de trombofilia se recomiendan ambos abordajes por su complementariedad: funcional con una técnica coagulométrica para resistencia a la proteína C activada y genético con una reacción en cadena por la polimerasa para el factor V Leiden.

Variante G20210A del gen de la protrombina (FII G20210A)

El interés por el gen de la protrombina (FII) se limitaba al estudio de algunas familias aisladas con hemorragia hasta que Poort *et al* (1996) describen la sustitución de un único nucleótido (G→A) en la posición 20210, correspondiente a una región no codificante 3' (reguladora) del mismo (37). Su mayor prevalencia en una población trombótica, seleccionada (18% en casos familiares) o no (6%), frente a una población

libre de enfermedad tromboembólica venosa (2%) la confirmaron como la segunda causa genética más prevalente (excluido el grupo no-O). En el artículo original ya se establece su asociación con una elevada concentración funcional de protrombina, que podría atribuirse a un incremento en la eficacia de la transcripción. Sin embargo, la evaluación coagulométrica de la protombina muestra tal grado de solapamiento entre portadores y no portadores de esta variación que carece de valor discriminante (37-39), por lo que se sigue requiriendo la reacción en cadena por la polimerasa para su diagnóstico.

La asociación se constató en diversos estudios aunque generalmente se le atribuye un riesgo relativo inferior al del factor V Leiden (entre 2-4) (37,38,40). Su prevalencia parece disminuir de sur (3-6%) (38, 41, 42) a norte de Europa (1-2%) (37,40,42), al contrario de lo que ocurre con aquel. En nuestro medio aparece en el 8-10% de pacientes consecutivos con enfermedad tromboembólica venosa (38) (tabla I). Muestra similitudes clínico-epidemiológicas con el factor V Leiden: rareza entre sujetos de origen no europeo (33), probable implicación en trombosis venosa cerebral (43), incremento de riesgo de trombosis venosa entre mujeres que reciben anovulatorios (43) o escasa influencia en la tasa de recidivas tras

suspender la anticoagulación (44). Aunque tampoco reduciría la esperanza de vida, su implicación diferencial con relación al embolismo pulmonar no resulta tan clara como en el caso del factor V Leiden (30,45,46). Ambas variantes genéticas podrían estar implicadas en complicaciones gestacionales tipo aborto recurrente, muerte fetal intrauterina, abrupcio placentae o preeclampsia (lo que ha venido a reforzar la hipótesis trombótica de estas gestosis y a abrir una vía de prevención a base de heparinas de bajo peso molecular) (47).

Por el contrario, los *dobles heterocigotos* (FVL / FII 20210A) presentarían una auténtica trombofilia; con un riesgo relativo de enfermedad tromboembólica venosa próximo a 20, expresan una evidente sinergia al superar la suma de los riesgos individuales (tabla I) (46). Asimismo, la inferior edad de presentación y la superior tasa de recidivas (al finalizar la anticoagulación) (48,49), confirman los conceptos de umbral y multicausalidad (6,8). Aún así la penetrancia nunca es total, existiendo ancianos que han permanecido asintomáticos gracias a interacciones favorables gen-gen y gen-ambiente.

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS FACTORES GENÉTICOS DE RIESGO

Múltiples factores protrombóticos de tipo genético se consideran en el momento actual candidatos a confirmar (o excluir) en un futuro inmediato, cuando se disponga de estudios funcionales o epidemiológicos más amplios y prospectivos. Con el avance del proyecto genoma humano y la descripción de un número continuamente creciente de polimorfismos de nucleótido único localizados en los genes teóricamente candidatos (relación actualizada en <http://snp.cshl.org/data/>), aumenta el interés por explicar las diferencias interindividuales observadas, a partir de su asociación con estos polimorfismos. Abundan los estudios de epidemiología genética que describen únicamente el exceso de prevalencia de algún polimorfismo de nucleótido único en población trombótica frente a un grupo similar de controles, aunque son poco demostrativos acerca de su potencial causalidad. El polimorfismo así descrito en asociación con la enfermedad podría ser un mero marcador de la variante genética patogénica, con la que se encontraría en desequilibrio de ligamiento.

Se precisan estudios funcionales (de investigación básica) en los que se establezca la relación entre un polimorfismo y una variación específica en la eficacia de la transcripción (cultivos celulares transgénicos con inserción de la secuencia variante del gen a estudio y análisis de las consecuencias bioquímicas). Asimismo se requieren estudios funcionales («analíticos») que estudien el polimorfismo de nucleótido único mediante reacción en cadena por la polimerasa y la correspondiente proteína (en suero o plasma mediante enzimo-inmunoanálisis o en membrana celular por citometría de flujo).

Los estudios epidemiológicos que relacionan *genotipo*, *fenotipo funcional*, *fenotipo «analítico»* y *clínica* se considerarían más demostrativos. También resultarían aceptables aquellos que encuentran asociación entre genotipo y fenotipo «analítico», si se apoyan en la publicación previa de los correspondientes estudios experimentales.

Es bien conocido que portadores de la misma mutación se presentan en clínica con diferente fenotipo y que sujetos con igual fenotipo pueden albergar mutaciones y polimorfismos diferentes. Resulta evidente que el repertorio de fenotipos clínicos es muy limitado en comparación con los fenotipos «ana-

líticos» y especialmente con el ingente potencial combinatorio de los numerosos polimorfismos (entre millones que pueblan el genoma) que podrían influir en cada uno. Los *estudios de casos y controles* (de tamaño habitual) solo tendrían poder estadístico para evaluar variaciones genéticas de prevalencia superior al 2-5%; incluso cuando el alelo variante es un factor de riesgo débil, esto requerirá muestreos muy amplios con altos costes (50).

Por el contrario para descubrir mutaciones (alelos con fuerte riesgo asociado y prevalencias inferiores a 1%) se prefieren estudios de ligamiento en el seno de familias afectadas (sin otra causa conocida); en ellos, se valora la *cosegación* de un fenotipo «analítico» con la existencia de trombosis clínica aunque (como en el caso de la antitrombina) (7) tengan que transcurrir muchos años antes de que se pueda identificar la lesión molecular subyacente (3). Algunos estudios familiares han optado por la secuenciación completa del gen en todos los miembros buscando polimorfismos asociados al fenotipo analítico y clínico (como refleja la historia del descubrimiento del alelo 20210A del gen de la protrombina) (37). En estudios familiares las llamadas *fenocopias* suponen una dificultad añadida: sujetos libres del alelo variante pero que también han sufrido trombosis por acumulación de factores de riesgo ambientales (o por interacción específica de algún factor de riesgo ambiental con otro/s factor/es de riesgo oculto/s o desconocidos). Para seguir avanzando se requerirá un mayor desarrollo de la bioinformática.

También se emplean estudios familiares para conocer la heredabilidad de un cierto fenotipo (siguiendo procedimientos estadísticos similares a los aplicados en estudios de gemelos). Así se ha publicado la heredabilidad de varios factores hemostáticos (51, 52). En relación con estas posibilidades el proyecto GAIT (*Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia*) ha acometido la búsqueda de locus asociados a la susceptibilidad para sufrir trombosis familiar, empleando técnicas de componentes de la varianza aplicadas al análisis del ligamiento genético entre marcadores. Los estudios del proyecto GAIT demuestran la asociación genética entre el locus ABO y las concentraciones plasmáticas de factor von Willebrand (53) o entre trombosis y sensibilidad a la proteína C activada, homocisteína o factores de la coagulación (factor VIII coagulante/factor von Willebrand, IX, XI) (54).

VARIANTES GENÉTICAS PROBABLEMENTE ASOCIADAS A ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA

Serían aquellas que han sido reconocidas solo de forma preliminar (pendientes de confirmación) o que están sumidas en alguna inconsistencia metodológica. Los factores de riesgo (y factores de protección) genéticos, con candidatura mejor establecida se relacionan a continuación (ver tabla III).

Polimorfismo Val34Leu del factor XIII

El factor XIII activado o estabilizador de la fibrina (FSF) se requiere para conformar una malla de fibrina resistente al flujo sanguíneo, tras su polimerización inicial. Se han descrito más de 20 mutaciones en familias aisladas, causando un déficit marcado o incluso ausencia completa (lógicamente cursando con hemorragias).

La activación factor XIII→factor XIII activado se debe al corte efectuado por la trombina (figuras 2 y 3) en la Arg37 de

Tabla III. Variantes genéticas probablemente involucradas en el riesgo o protección frente al tromboembolismo venoso

Anomalía	Prevalencia (%)		Odds Ratio	Referencia bibliográfica
	En Población general	TEV no seleccionado		
Factor V (haplotipo HR2)	heterocigosis: 8-10 homocigosis: 0,2	10-20 0,5	1,5-2 (?)	34
Factor XIII Val 34 Leu	(Leu/Leu): 3-10	2-6	0,5-0,8 (?)	57,58, 60
Factor Tisular -1208 D/I	(I/D+D/D): 77	71	0,72 (?)	61
Mutaciones de TM EPCR (4031 I/D)	< 1 < 1	3 (?) 3-4	(?) 4,6	68 70
PAI-1 (-675 4G/5G)	4G/4G: 25-30	30-35	1-1,5 (?) (5-10 si Factor V Leiden/PS)	74-75
Polimorfismos de PC	CC/GG: 35-50	43-66	1,5-2	78

TEV: tromboembolismo venoso; FT: factor tisular, TM: trombomodulina, EPCR: receptor endotelial de la PC, PAI-1: inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno; PC: proteína C; PS: proteína S
Las cifras de prevalencia deben considerarse sólo a título orientativo.

su subunidad A. La referida variante molecular introduce un cambio (a tres aminoácidos de distancia) de modo que Leu34 se asoció a una activación trombínica más rápida y una mayor eficiencia funcional en la polimerización de la fibrina (55,56), con unas concentraciones plasmáticas de factor XIII fisiológicas (56).

De este modo –por el momento–, los estudios que asocian la homocigosis Leu/Leu34 con una protección antitrombótica (57, 58) o con un aumento en el riesgo de una hemorragia cerebral (59), están desprovistos de fundamento funcional (unido a que otros estudios no observan esta relación) (56,60). Esta aparente paradoja (debería producir trombosis) ha impulsado la biología molecular específica de esta región del factor XIII.

Gen del factor tisular (FT) (polimorfismo -1208 D/I)

El factor tisular es el iniciador (cebador) de la coagulación dentro del organismo vivo (figura 2). En el contexto del PATHROS (*Paris Thrombosis Study*) fue secuenciado el promotor de su gen, encontrándose 4 polimorfismos (3 polimorfismos de nucleótido único y un polimorfismo inserción/delección) plenamente concordantes. La pérdida de un segmento de 18 nt (alelo delección o «D») en la posición 1208 de este promotor fue asociada a una menor concentración de factor tisular soluble (FTs) en plasma y a una moderada protección antitrombótica (*Odds Ratio* = 0,72) (61) (tabla III).

Gen del factor von Willebrand (polimorfismo -1234 C/T)

En estudios de fenotipo como el LETS (*Leiden Thrombophilia Study*), concentraciones elevadas de factor von Willebrand se asociaron claramente a un mayor riesgo de tromboembolismo venoso (15).

Tres polimorfismos de nucleótido único en el promotor del gen del factor von Willebrand bien representados por el polimorfismo referido se asocian con concentraciones elevadas (62), aunque aún no se ha podido probar su implicación en estudios epidemiológicos (tabla II).

Gen del factor VIII (polimorfismo desconocido)

El factor VIII estaría claramente asociado con el riesgo de enfermedad tromboembólica venosa en una forma directamente proporcional (factor de riesgo continuo); así en el LETS, un factor VIII >150 UI/dL (en técnica coagulativa), supone un riesgo relativo de 4,8 con relación a los pacientes que no alcanzan este valor (15). A pesar de una amplia secuenciación de regiones reguladoras (=no codificantes) en su correspondiente gen (F8), no se ha podido encontrar ningún polimorfismo que justifique las diferencias observadas (63).

Dado que la enfermedad tromboembólica venosa asocia una marcada reacción inflamatoria de fase aguda, los estudios de fenotipo (para factor VIII) se deben posponer (unos seis meses desde el último episodio). Sin embargo, la elevación de factor VIII suele persistir en el tiempo, no se corresponde con otros reactantes (64) y muestra una fuerte heredabilidad (como demuestran los investigadores de Leiden y el proyecto GAIT) (51,53,54). Si bien los determinantes principales (conocidos) de la concentración de factor VIII son ya dos factores genéticos (grupo sanguíneo ABO y concentraciones de su transportador, el factor von Willebrand), podrían existir otros reguladores aún desconocidos (tabla II).

Gen de la cadena beta del fibrinógeno (-455 G/A)

El fibrinógeno además de intervenir en la coagulación o en la adhesividad y agregación plaquetarias, contribuye a la viscosidad sanguínea. Sus tres cadenas (α , β y γ) están codificadas por sus tres respectivos genes (agrupados en una región de 50 kb del cromosoma 4); cada gen tiene –dentro del promotor– una secuencia que responde a la concentración de IL-6 (mediador de respuesta inflamatoria), aunque la cantidad de cadena β resulta limitante en la producción de las otras dos, en estudios fuera del organismo (65). Entre los numerosos polimorfismos que se han descrito en el gen de la cadena β al menos -854G/A y -455G/A estuvieron asociados, independientemente, con la concentración plasmática de fibrinógeno. En las series de casos de enfermedad tromboembólica venosa las concentraciones de fibrinógeno son mayores que en sus correspondien-

tes controles; así se observó en el LETS (*Leiden Thrombophilia Study*) (66) (tabla II). Aunque obviamente, también puede comportarse como un reactante (igual que el factor VIII), su heredabilidad parece significativa (52). Si bien los estudios están más avanzados en trombosis arterial que en trombosis venosa (67) (un primer estudio con -455G/A ha resultado negativo) (66), el interés continúa siendo alto.

Mutaciones o polimorfismos en el gen de la trombomodulina

La trombomodulina es una proteína integral de la membrana endotelial que actúa como receptor de la trombina (FIIa) invirtiendo su actividad procoagulante (la convierte en anticoagulante al acelerar 20000 veces la activación proteína C → proteína C activada) mientras permanece ligada (figura 2). Algunos fragmentos desprendidos constituyen su forma *soluble* (trombomodulina soluble), que es posible analizar en plasma (técnica enzimoimmunoanálisis) y se ha sugerido como marcador de daño endotelial.

Por la preponderancia del sistema inhibitorio de la proteína C en la patogenia de la enfermedad tromboembólica venosa, Ohlin *et al* sospecharon su implicación y consiguieron describir diversas mutaciones (483Pro→Leu, 468Asp→Tyr, 61Gly→Ala) en familias con trombofilia (68) (las concentraciones de trombomodulina soluble eran fisiológicas pero no se pudo descartar un descenso de trombomodulina endotelial ni una posible disfunción por cambio conformacional). Se trataría casi de mutaciones privadas, aunque –en opinión de sus descubridores– acumulando todas ellas podrían suponer un 4-5% de casos de enfermedad tromboembólica venosa (68), una situación semejante a la descrita para los otros miembros de su sistema (proteína C y proteína S) (4, 5).

Existen también 3 polimorfismos (el dimorfismo 1418C/T que predice un cambio 455Ala→Val no relacionado con la prevalencia de enfermedad tromboembólica venosa (69), Ala25Thr en la región codificante y -33G/A cerca del promotor).

Gen del receptor endotelial de la proteína C (polimorfismo 4031 I/D)

Asociado con la trombomodulina en la membrana endotelial de los grandes vasos se encuentra el receptor de la proteína C (logran conjuntamente la activación proteína C → proteína C activada) (figura 2). Aunque podría resultar una «diana» prometidora, algunas de sus variantes genéticas (como la inserción de 23 nucleótidos en el exón 3, nt4031 que produce un codón de finalización prematura o *stop-codon* y un receptor endotelial de la proteína C truncado) parecen ser letales en estado homocigoto por lo que no abundan los heterocigotos; aunque estos parecen cursar con un aumento de riesgo de enfermedad tromboembólica venosa (*odds ratio* = 4,6), las variantes genéticas con frecuencias alélicas inferiores al 1% tienden a mostrar mejor su efecto en estudios familiares, que de casos-controles (70).

La eventual comercialización de algún método de enzimoimmunoanálisis para estudiar su fenotipo reduciría la incertidumbre.

Gen del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) (polimorfismo -675 4G/5G)

El inhibidor del activador del plasminógeno es una serpina que bloquea la fibrinólisis producida por el t-PA (activador tisular

del t-plasminógeno) (figura 3). Debido a que en el plasma se encuentra en exceso (molar), con relación a este, evita la fibrinólisis sistémica y continuada (tolerando solo la fibrinólisis local fisiológica); sin embargo su excesivo incremento posibilitaría que el coágulo (hemostático) se convierta en invasivo (trombo oclusivo). Se ha investigado más en relación con los trombos arteriales que venosos, debido a su conocido incremento en relación con la hipertrigliceridemia, la diabetes y el síndrome plurimetabólico (en casos de enfermedad coronaria).

Un dimorfismo del tipo inserción / deleción de una guanina (dos tipos de alelo: cuatro guaninas o cinco guaninas), se ha localizado en el promotor (a 675 pares de bases (pb) del sitio de arranque de la transcripción) y se relaciona claramente con este fenotipo.

La asociación del alelo -675 4G con el aumento de la transcripción fue establecida por los ensayos de transfección (el alelo 5G permite el anclaje de una proteína represora a diferencia del 4G) (71, 72). Además en un área próxima del promotor (residuos -672 a -657) ambos alelos poseen una región de respuesta a los triglicéridos-VLDL (llamada VLDLRE) (73).

Los sujetos homocigotos 4G/4G tienden a mostrar unas concentraciones del inhibidor del activador del plasminógeno un 25% superiores a los sujetos 5G/5G (con los heterocigotos 4G/5G situados en valores intermedios). Sin embargo, no se comportó como factor de riesgo venoso (74, 75) salvo en subgrupos concretos como los portadores del factor V Leiden (76), o los afectados por un déficit congénito de proteína S (probable incremento de los embolismos pulmonares) (77).

Gen de la proteína C (polimorfismos -1654 C/T y -1641 G/A)

Además de las múltiples mutaciones privadas conocidas en este gen (4), algunos polimorfismos de su promotor (asociados en un haplotipo) controlarían las concentraciones de proteína C en el conjunto de la población (ya que todos portamos alguna de las combinaciones). Dos prestigiosos grupos de investigación (LETS y PATHROS respectivamente) (78, 79) han demostrado una ligera asociación con la enfermedad tromboembólica venosa (portadores del alelo CG –*odds ratio* = 1,39– y homocigotos CG/CG = 1,6) (78, 79) que estaría pendiente de confirmación.

Gen del factor XII (polimorfismo 46 C/T)

Recientemente identificado por Soria *et al* en el seno del proyecto GAIT, podría tratarse del auténtico polimorfismo funcional implicado en el control de la actividad del factor XII (aunque no se descarta que corresponda a una región próxima en desequilibrio de ligamiento); en cualquier caso aparece asociado al riesgo tromboembólico (80). Los homocigotos variantes (TT) tendrían una menor actividad del factor XII que los genotipos más frecuentes CT y CC (50-60% frente al 90 y 130% respectivamente) y un mayor riesgo (dado el papel del factor XII en la activación de la fibrinólisis).

Otros polimorfismos en genes relacionados con la hemostasia

Diversos genes hemostáticos y sus respectivos polimorfismos están siendo investigados con un inusitado dinamismo dadas sus posibilidades patogénicas teóricas, aunque nos limitaremos a mencionarlos:

- Gen del factor II (dimorfismo 19911 G/A) (81).
- Gen del factor VII (Arg353Gln) (66).
- Genes de los factores V, X y XI.
- Gen de la proteína S (dimorfismos de PROS1: A2148G, C2698A) (82).
- Gen del TFPI (Inhibidor de la vía del factor tisular) (figura 2) (diversos polimorfismos).
- Gen del cofactor II de la heparina (CIIH).
- Gen del TAFI (Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina) (figura 3).
- Gen del t-PA (activador tisular del plasminógeno) (dimorfismo I/D intrón h).
- Genes de glicoproteínas de membrana plaquetaria (mayor interés en la trombosis arterial).

Polimorfismos localizados en genes no vinculados directamente con la hemostasia

El interés por los condicionantes genéticos de variabilidad en trombosis venosa no se agota o limita a las proteínas de las vías de la coagulación / fibrinólisis. Otras muchas cascadas o rutas metabólicas podrían indirectamente condicionar fenómenos trombóticos.

1°. Metabolismo de la homocisteína (Hcy)

Este aminoácido azufrado es un producto intermedio del metabolismo de la metionina; desde hace tiempo se ha relacionado con la trombosis (arterial o venosa) a una edad juvenil a través de los raros casos de aumentos graves de la concentración de homocisteína sérica (u homocistinurias) (entre 1/50000 y 1/350000 de la población) correspondientes a homocigosis de mutaciones privadas en los enzimas que controlan su metabolismo (en su forma clásica localizadas en la cistationina beta-sintetasa, CBS). Mayor interés se produce al constatarse que también unas concentraciones ligera o moderadamente elevadas de homocisteína son un factor de riesgo venoso (83) (e incluso arterial) y que pueden ser controlados de forma sencilla y económica, suplementando la dieta con folato (84, 85). Se avanza en los estudios para probar que reducir la concentración de homocisteína también reducirá los riesgos. El hallazgo en el gen de la metilén tetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) de un polimorfismo 677C→T que puede elevar ligeramente las concentraciones de homocisteína (en el 10% de la población de nuestro medio –los sujetos homocigotos *variantes* o T/T–) en ausencia de suficiente folato dietético (86), desató su interés en la literatura médica hace 4-5 años (87). Sin embargo, a pesar de algunos estudios positivos, el consenso general actual asigna a esta variante termolábil de metilén tetrahidrofolato reductasa un riesgo cardiovascular nulo o marginal (87-89) por lo que –a diferencia de la homocisteína– no se recomienda su determinación rutinaria en el estudio de trombofilia. Tampoco parece condicionar el grado de respuesta al folato que se produce en los casos con aumentos de la concentración de homocisteína sérica (85).

2°. Enzima convertidor de la angiotensina (ECA)

Relacionada con el grado de vasoconstricción sistémica y la respuesta fibrinolítica fisiológica (concentración del inhibidor del activador del plasminógeno), se encontraría un polimorfismo inserción/ deleción, con presencia (alelo I) o ausencia (alelo D) de una secuencia de 287 pb, en una región no codificante (intrón 16). Esta región se relaciona con un 30-50% de la variabilidad observada en la actividad de la ECA y se comu-

nicó un aumento del riesgo entre los sujetos D/D, varones, de raza afroamericana (89) y en sujetos de raza blanca intervenidos de cirugía de cadera (90). Esta asociación no se observó en población general de raza caucásica (91).

3°. Sintasa del óxido nítrico (endotelial, eNOS)

Esta enzima, que genera el principal vasodilatador endógeno conocido (óxido nítrico), interviene en la regulación del tono vascular (y probablemente en el reclutamiento de las plaquetas); está sometida a una variación genética que se intenta relacionar con la patología arterial (hipertensión arterial, espasmo coronario y enfermedad coronaria).

En el 4º intrón de su gen existen variaciones del número de repeticiones de una secuencia constante (4 vs. 5 repeticiones de un fragmento de 27 pb) que se relacionó con enfermedad tromboembólica venosa en afroamericanos (92); sin embargo ni este ni otro polimorfismo determinante de la actividad eNOS (el polimorfismo de nucleótido único –786T/C), pudieron ser relacionados con enfermedad tromboembólica venosa en sujetos caucásicos (93).

4°. Genes del metabolismo lipídico

La hipótesis de que los lípidos pudieran participar en la trombosis, no solo arterial sino también venosa se está consolidando. Así, el aumento de lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL) se relacionó con el aumento de factores vitamina K-dependientes y con la activación de la coagulación por la vía del factor tisular (con eficiencia próxima a la de la fosfatidilserina) (94). Además, se ha descubierto, recientemente, el papel procoagulante del LDL oxidado (incrementando más de diez veces la generación de trombina) (95) y el anticoagulante del colesterol ligado a HDL (96) (inactivación del factor V activado), de la fosfatidiletanolamina, de la cardioplipina (97) y de la glicosilceramida (98).

La lipoproteína (a) [Lp(a)] presenta unas concentraciones fuertemente determinadas por el gen de la apolipoproteína (a) y condiciona una hipofibrinólisis (compite con el plasminógeno por su gran parecido estructural) asociándose a enfermedad tromboembólica venosa (99).

Estos datos sustentarán nuevas líneas de investigación relacionando los genes de algunas lipoproteínas y enzimas del metabolismo lipídico, con la trombosis (100).

5°. Genes de mediadores inflamatorios

Otra hipótesis plantea que algunas citoquinas y quimioquinas (proinflamatorias o antiinflamatorias) y sus receptores, podrían estar implicadas en la patogenia de la enfermedad tromboembólica venosa, o al menos asociarse con sus recurrencias como sugiere un reciente estudio (101).

SIGNIFICADO EVOLUTIVO DE LA VARIACIÓN GENÉTICA DE SIGNO PROTROMBÓTICO

Una especie sin variabilidad genética no podría experimentar una respuesta adaptativa óptima ante un entorno cambiante. ¿Cómo explicar que algunos polimorfismos claramente deletéreos, llamados «de riesgo», se encuentren tan extendidos entre la población?. Indudablemente han tenido que superar con éxito la presión selectiva a lo largo de decenas de miles de años; cada uno de ellos, a partir de la mutación ancestral, habrá aportado alguna ventaja evolutiva a sus portadores hasta lograr el grado actual de expansión en la población. Ciertamente, las

Tabla IV. Estudio de trombofilia. Indicaciones y análisis recomendados

Indicaciones			
(NOTA: la pertinencia del estudio indiscriminado de trombofilia en enfermedad tromboembólica venosa (EDEV) está sometida a debate)			
EDEV familiar EDEV en < 45 años EDEV sin causa aparente EDEV de localización anómala (visceral) EDEV recidivante Pérdida fetal recurrente (Estudio epidemiológico de otras trombosis)			
Pruebas recomendadas	Método recomendado	Frecuencia del hallazgo (#)	Requieren TAO prolongado (grado de consenso alcanzado)
ATIII	Amidolítico	+/-	++++
PC	Amidolítico	+/-	+++
PS libre (y total?)	ELISA	+/-	++
FVIIIc / FvW (recientemente)	(diversos métodos)	++++	++ / ¿?
ACA (IgG / IgM)	ELISA	+ / ++	++ / +++
Anticoagulante lúpico	Test coagulométricos	+ / ++	++++
Homocisteína	HPLC / EIA	+++	- / ¿? (+ ácido fólico?)
Factor V Leiden	PCR	+++	- / (*)+++ (**)++++
RPCa (técnica no modificada)	Test coagulométricos	+++	
Protrombina 20210A	PCR	++	- / (*)+++

EDEV: enfermedad tromboembólica venosa; TAO: tratamiento anticoagulante oral; ATIII: antitrombina III; PC: proteína C; PS: proteína S; RPCa: resistencia a proteína C activa; ACA: anticuerpos anticardiolipina; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución, EIA: enzoinmunoanálisis; PCR: reacción en cadena por la polimerasa

Frecuencias: (+/-) < 1%, (+) 1-5%, (++) 5-10%, (+++) 10-20%, (++++> 20%

(*) Solo en caso de asociación o doble heterocigosis

(**) Solo en caso de homocigosis

pérdidas hemorrágicas periparto son inferiores en las mujeres portadoras del factor V Leiden (102) y las hemorragias cerebrales espontáneas son bastante más infrecuentes entre sujetos factor V Leiden o FII 20210A (+) (103) que entre sujetos normales. Estos mecanismos interviniendo durante muchos miles de años (cuando la muerte por hemorragia era predominante) han supuesto un permanente y poderoso selector natural y aún hoy, aportan coherencia al hallazgo de una expectativa de vida normal en estos sujetos (31,104). Acaba de sugerirse que la propia implantación del embrión puede contribuir a difundir el factor V Leiden al confirmarse que los portadores tienen optimizado este proceso (105).

Si estos polimorfismos han podido –recientemente– cobrar un poder patógeno significativo, indudablemente se debe al cambio acelerado de *estilo de vida* (sedentarismo, obesidad, cirugía, tabaco, empleo de estrógenos), cuando no a su simple prolongación (*envejecimiento*).

SIGNIFICADO CLÍNICO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Nuestro conocimiento genético actual de las enfermedades *poligénicas* resulta extremadamente fragmentario para constituirse en una herramienta clínica poderosa (en las *monogénicas* se utilizan ya numerosas aplicaciones); apenas habríamos establecido la función del 10% de los –aproximadamente– 35-40000 genes humanos. A partir de lo conocido hasta este momento se estima que podría haber 2-3 transcritos por cada gen, unas 90000 proteínas (sin considerar las modificaciones postraslacionales), la mayoría de funciones múltiples (aún desconocidas); esto insinúa un largo camino por recorrer en

medicina molecular. Aun más, la progresiva comprensión del genoma revelará millones de polimorfismos de nucleótido único (se calcula que 1/500-1/3000 bases puede ser polimórfica); aunque muchos serán funcionalmente redundantes (estarán bien representados por otros más o menos próximos) o no serán expresivos, unos pocos miles de ellos estarán condicionando –dramáticamente– el riesgo de enfermar de la mayoría de la población durante la edad adulta (106). Además las interacciones gen-ambiente estarán bajo el control de múltiples factores de regulación transcripcional que empezamos –apenas– a conocer.

UTILIDAD PRÁCTICA: ESTUDIO DE TROMBOFILIA

Actualmente más de un 50% de casos consecutivos de enfermedad tromboembólica venosa no pueden relacionarse con una variante genética *conocida* ni *dura* (mutación), ni *blanda* (polimorfismo). Esto no significa que ignoremos solo la mitad de los condicionantes genéticos. Como hemos sugerido, en cada caso pueden estar actuando –simultáneamente– múltiples favorecedores (y también múltiples atenuantes) desconocidos, por lo que podríamos estar ignorando más del 90% de las interacciones relevantes. Aún así los hematólogos se están viendo presionados para efectuar más y más estudios de trombofilia y para tomar decisiones (principalmente acerca de la duración óptima del tratamiento anticoagulante) en ausencia de auténticos consensos basados en la evidencia. La tendencia actual dominante sería la de efectuar el estudio completo de trombofilia solo en los casos señalados en la tabla IV debido a los elevados costes, a la ausencia de tratamiento corrector para

la mayoría de las alteraciones y a la escasez de unos patrones terapéuticos específicos.

Al menos deberíamos ser conscientes que en esta etapa –diríamos transitoria– una aplicación clínica indiscriminada de algunos conocimientos superficiales entraña algunos peligros:

–**Inadecuada estimación de riesgos:** los clínicos no especializados tienden a sobreestimar el riesgo trombótico asociado con las trombofilias congénitas (lo que resulta inapropiado en el caso de las «blandas» como el factor V Leiden o la mutación de la protrombina) y a subestimar los riesgos asociados con la anticoagulación. Esto podría conducir a incrementar el INR considerado terapéutico o a prolongar innecesariamente un tratamiento con cumarínicos en un porcentaje excesivo de casos (107).

Los hematólogos expertos optarán por una anticoagulación prolongada en presencia de un anticoagulante lúpico y la mayoría, en presencia de un déficit de antitrombina; sin embargo, concederán un menor significado a un déficit de proteína S aislado o a un título bajo de anticuerpos anticardiolipina (tabla IV), de modo que su decisión final estará influenciada por otras variables de tipo clínico. Hoy se admite que prolongar la anticoagulación (más de los seis meses habituales) resulta obligado en los casos de factor V Leiden homocigoto o heterocigoto asociado a mutación de protrombina o déficit de proteína S, pero no en los habituales portadores heterocigóticos aislados (tabla IV).

–Otra prueba de evaluación simplista de riesgos es la **falsa seguridad:** los clínicos tienden a identificar la ausencia de una anomalía conocida con la evidencia de que la tendencia trombótica será baja, ignorando que la mayoría de las alteraciones no han sido aún identificadas.

–Podemos engendrar **confusión en los pacientes** con increíble facilidad; se requiere una gran competencia profesional para no inducir una falsa seguridad o una ansiedad innecesaria.

Para el resto de situaciones no recogidas en la tabla IV lo indicado sería individualizar las pruebas a efectuar considerando que cualquier paciente con enfermedad tromboembólica venosa se puede beneficiar de un escrutinio de anticuerpos antifosfolípido y probablemente de homocisteína, aunque con un desencadenante tan claro como una neoplasia activa, la utilidad de estas pruebas se desvanece.

Recordemos que la aplicación indiscriminada de los parámetros de trombofilia *hereditaria* al estudio de la trombosis *arterial* podría considerarse (en el momento actual), una mala práctica. Los hematólogos expertos en este campo están obligados a ilustrar a sus colegas y a reorientar o incluso devolver, muchas de las solicitudes que reciben (107).

PERSPECTIVAS DE FUTURO

Los expertos conjeturan que la asociación entre los polimorfismos de nucleótido único y las enfermedades cardiovasculares será mayor aún de lo que sospechamos, pero las conexiones entre regiones alejadas del genoma deben ser también más frecuentes y los patrones de interacción genotipo-ambiente-fenotipo más complejos, de lo que hemos venido suponiendo hasta ahora (108) lo que obligará al empleo de la bioinformática (109).

La genética se está transformando en genómica a medida que reemplaza el estudio de un único gen y sus funciones por el de múltiples genes interdependientes y sometidos a regula-

ción (110). Una de las herramientas empleadas en el estudio de la compleja genómica funcional será el llamado *chip de DNA/RNA (microarray)*; permite efectuar miles de análisis mediante técnica de hibridación, a partir de una gotita de muestra biológica de un individuo, o cultivo celular, empleando como soporte una lámina de vidrio, celulosa o nylon del tamaño de un porta; el patrón de hibridación (y la consiguiente fluorescencia o quimioluminiscencia) será posteriormente leído por un scanner e interpretado por un ordenador (109, 111).

Más aún, el universo de las proteínas es de un grado de complejidad muy superior al de los ácidos nucleicos (a diferencia de estos, admiten diferentes conformaciones, estados funcionales, tipos de *ligandos* y ubicaciones celulares lo que les confiere tareas muy diferentes). Muchas de las nuevas proteínas que se describan pertenecerán a rutas metabólicas actualmente desconocidas o incompletas (con frecuencia obtenidas a partir de la comparación con genomas de otras especies). Se estima que el *proteoma* podría tener varios ordenes de complejidad por encima del genoma y requerirá también del empleo de «*chips* proteicos» o «proteómicos» (*protein arrays*) (112).

Aunque algunos autores consideren plazos inferiores (109), parece razonable que en unos diez o quince años podamos comenzar a calcular las primeras puntuaciones (*scores*) de riesgos para enfermedades poligénicas con *chips* de fiabilidad creciente (validados en estudios prospectivos). Esto si debería a ayudar al manejo clínico de la enfermedad tromboembólica venosa, a individualizar las profilaxis y a establecer una farmacoterapia más personalizada que en la actualidad.

A medida que se completen los mapas de polimorfismos de nucleótido único y se resuelvan los enigmas de la genómica funcional (110), el transcriptoma y el proteoma, se irán estableciendo guías y directrices diagnósticas y terapéuticas, distintas (quizá totalmente nuevas) para los problemas trombóticos.

En conclusión, a pesar del desarrollo explosivo de la genética molecular en la última década nuestro conocimiento es aún rudimentario y superficial: ignoramos la mayoría de los genes y polimorfismos relevantes, estamos solo empezando a intuir las primeras interacciones gen-gen y gen-entorno y precisamos de toda la imaginación posible para desarrollar nuevas herramientas genéticas y lanzar la bioinformática que acabamos de inaugurar. Comprender (y eventualmente corregir) fenómenos tan complejos como el tromboembolismo representa un formidable reto que probablemente ocupará todo el siglo que comienza.

Correspondencia:
Dr. Ángel José González Ordóñez.
Servicio de Hematología.
Hospital S. Agustín.
33400 Avilés. Asturias.
E-mail: jagonzalez@medynet.com

BIBLIOGRAFÍA

1. Lilienfeld DE, Chan E, Ehland J, Godbold JH, Landrigan PJ, Marsh G. Mortality from pulmonary embolism in the United States: 1962 to 1984. *Chest* 1990; 98: 1067-72.
2. Heit JA, Mohr DN, Silverstein MD, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ III. Predictors of recurrence after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based cohort study. *Arch Intern Med* 2000; 160: 761-8.

3. Lane DA, Olds RJ, Boisclair M, Chowdhury V, Thein SL, Cooper DN, *et al.* Antithrombin III mutation database: first update. *Thromb Haemost* 1993; 70: 361-9.
4. Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, Gandrille S, Greengard JS, Ireland H, *et al.* Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. *Thromb Haemost* 1995; 73: 876-9.
5. Gandrille S, Borgel D, Sala N, Espinosa-Parrilla Y, Simmonds R, Rezende S, *et al.* Protein S deficiency: a database of mutations-summary of the first update. *Thromb Haemost* 2000; 84: 918 (letter).
6. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353: 1167-73.
7. Egeberg O. Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965; 13: 516-30.
8. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, *et al.* Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 1996; 76: 651-62.
9. Egeberg O. Inherited fibrinogen abnormality causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1967; 17: 176-87.
10. Al-Mondhiry H, Bilezikian SB, Nossel HL. Fibrinogen "New York"-an abnormal fibrinogen associated with thromboembolism: functional evaluation. *Blood* 1975; 45: 607-19.
11. Thorsen LI, Brosstad F, Solum NO, Stormorken H. Increased binding to ADP-stimulated platelets and aggregation effect of the dysfibrinogen Oslo I as compared with normal fibrinogen. *Scand J Haematol* 1986; 36: 203-10.
12. Wada Y, Lord ST. A correlation between thrombotic disease and a specific fibrinogen abnormality (A alpha 554 ArgàCys) in two unrelated kindred, Dusart and Chapel Hill III. *Blood* 1994; 84: 3709-14.
13. Jick H, Slone D, Westerholm B, Inman WH, Vessey MP, Shapiro S, *et al.* Venous thromboembolic disease and ABO blood type. A cooperative study. *Lancet* 1969; 1: 539-42.
14. Vlot AJ, Mauser-Bunschoten EP, Zarkova AG, Haan E, Kruitwagen CL, Sixma JJ, *et al.* The half-life of infused factor VIII is shorter in hemophiliac patients with blood group O than in those with blood group A. *Thromb Haemost* 2000; 83: 65-9.
15. Koster T, Blann AD, Briët E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* 1995; 345: 152-5.
16. Kraaijenhagen RA, Anker PSI, Koopman MMW, Reitsma PH, Prins MH, van den Ende A, *et al.* High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2000; 83: 5-9.
17. González-Ordóñez AJ, Medina Rodríguez JM, Martín L, Alvarez V, Coto E. The O blood group protects against venous thromboembolism in individuals with the factor V Leiden but not the prothrombin (factor II G20210A) mutation. *Blood Coagul Fibrinol* 1999; 10: 303-7.
18. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; 68: 1370-3.
19. Koster T, Rosendaal FR, Briët E, van der Meer FJM, Colly LP, Trienekens PH, *et al.* Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood* 1995; 85: 2756-61.
20. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1984; 74: 2082-8.
21. 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 U S A* 1993; 90: 1004-8.
22. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, *et al.* Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-7.
23. Kalafatis M, Bertina RM, Rand MD, Mann KG. Characterization of the molecular defect in factor V R506Q. *J Biol Chem* 1995; 270: 4053-57.
24. Koeleman BPC, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C-deficient families. *Blood* 1994; 84: 1031-5.
25. Zöller B, Bernsdotter A, García de Frutos P, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood* 1995; 85: 3518-23.
26. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85: 1504-8.
27. Martinelli I, Landi G, Merati G, Cella R, Tosi A, Mannucci PM. Factor V gene mutation is a risk factor for cerebral venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1996; 75: 393-4.
28. Desmarais S, de Moerloose P, Reber G, Minazio P, Perrier A, Bounameaux H. Resistance to activated protein C in an unselected population of patients with pulmonary embolism. *Lancet* 1996; 347: 1374-5.
29. Turkstra F, Karemaker R, Kuijter PM, Prins MH, Buller HR. Is the prevalence of the factor V Leiden mutation in patients with pulmonary embolism and deep vein thrombosis really different? *Thromb Haemost* 1999; 81: 345-8.
30. Ordóñez AJ, Carreira JM, Alvarez CR, Rodríguez JM, Alvarez MV, Coto E. Comparison of the risk of pulmonary embolism and deep vein thrombosis in the presence of factor V Leiden or prothrombin G20210A. *Thromb Haemost* 2000; 83: 352-4.
31. Mari D, Mannucci PM, Duca F, Bertolini S, Franceschi C. Mutant factor V (Arg506Gln) in healthy centenarians. *Lancet* 1996; 347: 1044 (letter).
32. Vandenbroucke JP, Koster T, Briët E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994; 344: 1453-7.
33. Rees DC, Chapman NH, Webster MT, Guerreiro JF, Rochette J, Clegg JB. Born to clot: the European burden. *Br J Haematol* 1999; 105: 564-6.
34. Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E, Lunghi B, Castaman G, Sacchi E, *et al.* A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood* 1997; 90: 1552-7.
35. Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306àThr) associated with resistance to activated protein C. *Blood* 1998; 91: 1140-4.
36. Simioni P, Scudeller A, Radossi P, Gavasso S, Girolami B, Tormene D, *et al.* "Pseudo homozygous" activated protein C resistance due to double heterozygous factor V defects (factor V Leiden mutation and type I quantitative factor V defect) associated with thrombosis: report of two cases belonging to two unrelated kindreds. *Thromb Haemost* 1996; 75: 422-6.
37. 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: 3698-03.
38. González-Ordóñez AJ, Medina Rodríguez JM, Fernández Álvarez CR, Sánchez García J, Martín L, Coto E, *et al.* Mutación 20210A del gen de la protrombina y tromboembolismo venoso. *Sangre* 1999; 44: 13-8.
39. González-Ordóñez AJ, Fernández Carreira JM, Alvarez MV, Martín Sánchez L, Medina Rodríguez JM, Coto E. A high factor II/ factor X functional ratio is not a useful predictor of the FII G20210A gene mutation in thromboembolic patients undergoing oral anticoagulant treatment. *Clin Chem* 2000; 46: 886-7.
40. Brown K, Luddington R, Williamson D, Baker P, Baglin T. Risk of venous thromboembolism associated with a G to A transition at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene. *Br J Haematol* 1997; 98: 907-9.
41. Souto JC, Coll I, Llobet D, del Rio E, Oliver A, Mateo J, *et al.* The prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thromb Haemost* 1998; 80: 366-9.
42. Rosendaal FR, Doggen CJM, Zivelin A, Arruda V, Aiach M, Siskovick D, *et al.* Geographic distribution of the prothrombin 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998; 79: 706-8.
43. Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Mannucci PM. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med* 1998; 338: 1793-7.
44. Eichinger S, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M, Mannhalter C *et al.* The risk of early recurrent venous thrombosis after oral anticoagulant therapy in patients with the G20210A transition in the prothrombin gene. *Thromb Haemost* 1999; 81: 14-7.
45. Meyer G, Emmerich J, Helley D, Arnaud E, Nicaud V, Alhenc-Gelas M *et al.* Factors V Leiden and II 20210A in patients with symptomatic pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *Am J Med* 2001; 110: 12-5.
46. Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T *et al.* Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism--pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. *Thromb Haemost* 2001; 86: 809-6.
47. Brenner B. Inherited thrombophilia and fetal loss. *Curr Opin Hematol* 2000; 7: 290-5.
48. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I *et al.* The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med* 1999; 341: 801-6.

49. Margaglione M, D'Andrea G, Colaizzo D, Cappucci G, del Popolo A, Brancaccio V *et al.* Coexistence of factor V Leiden and Factor II A20210 mutations and recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1583-7.
50. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996; 273: 1516-7.
51. Kamphuisen PW, Houwing-Duistermaat JJ, van Houwelingen HC, Eikenboom JCJ, Bertina RM, Rosendaal FR. Familial clustering of factor VIII and von Willebrand factor levels. *Thromb Haemost* 1998; 79: 323-6.
52. Souto JC, Almasy L, Borrell M, Gari M, Martínez E, Mateo J *et al.* Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families. *Circulation* 2000; 101: 1546-51.
53. Souto JC, Almasy L, Muñoz-Díaz E, Soria JM, Borrell M, Bayen L *et al.* Functional effects of the ABO locus polymorphism on plasma levels of von Willebrand factor, factor VIII, and activated partial thromboplastin time. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2024-8.
54. Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM *et al.* Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia*. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1452-9.
55. Kohler HP, Ariens RA, Whitaker P, Grant PJ. A common coding polymorphism in the Factor XIII-A subunit gene (FXIII Val34Leu) affects cross-linking activity. *Thromb Haemost* 1998; 80: 704 (letter).
56. Balogh I, Szöke G, Kárpáti L, Wartiovaara U, Katona E, Komáromi I *et al.* Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood* 2000; 96: 2479-86.
57. Catto AJ, Kohler HP, Coore J, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood* 1999; 93: 906-8.
58. Franco RF, Reitsma PH, Lourenco D, Maffei FH, Morelli V, Tavella MH *et al.* Factor XIII Val34Leu is a genetic factor involved in the etiology of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 81: 676-9.
59. Catto AJ, Kohler HP, Bannan S, Stickland M, Carter A, Grant PJ. Factor XIII Val 34 Leu: a novel association with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998; 29: 813-6.
60. Corral J, Gonzalez-Conejero R, Iniesta JA, Rivera J, Martinez C, Vicente V. The FXIII Val34Leu polymorphism in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica* 2000; 85: 293-7.
61. Arnaud E, Barbalat V, Nicaud V, Cambien F, Evans A, Morrison C *et al.* Polymorphisms in the 5' regulatory region of the tissue factor gene and the risk of myocardial infarction and venous thromboembolism: the ECTIM and PATHROS studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 892-8.
62. Keightley AM, Lam YM, Brady JN, Cameron CL, Lillicrap D. Variation at the von Willebrand factor (vWF) gene locus is associated with plasma vWF:Ag levels: identification of three novel single nucleotide polymorphisms in the vWF gene promoter. *Blood* 1999; 93: 4277-83.
63. Mansvelt EPG, Laffan M, McVey JH, Tuddenham EGD. Analysis of the F8 gene in individuals with high plasma factor VIII:c levels and associated venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1998; 80: 561-5.
64. O'Donnell J, Tuddenham EGD, Manning R, Kembell-Cook G, Johnson D, Laffan M. High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia screening: role of increased synthesis and relationship to the acute phase reaction. *Thromb Haemost* 1997; 77: 825-8.
65. Yu S, Sher B, Kudryk B, Redman CM. Fibrinogen precursors. Order of assembly of fibrinogen chains. *J Biol Chem* 1984; 259: 10574-81.
66. Koster T, Rosendaal FR, Reitsma PH, van der Velden PA, Briët E, Vandenbroucke JP. Factor VII and fibrinogen levels as risk factors for venous thrombosis. A case-control study of plasma levels and DNA polymorphisms—the Leiden Thrombophilia Study (LETS). *Thromb Haemost* 1994; 71: 719-22.
67. Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G *et al.* Beta fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. The ECTIM Study. *Circulation* 1996; 93: 440-9.
68. Ohlin AK, Marlar RA. Thrombomodulin gene defects in families with thromboembolic disease—a report on four families. *Thromb Haemost* 1999; 81: 338-44.
69. van der Velden PA, Krommenhoek-van Es T, Allaart CF, Bertina RM, Reitsma PH. A frequent thrombomodulin amino acid dimorphism is not associated with thrombophilia. *Thromb Haemost* 1991; 65: 511-3.
70. Merati G, Biguzzi E, Oganessian N, Fetiveau R, Qu DF, Buciarelli P *et al.* A 23bp insertion in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene in patients with myocardial infarction and deep vein thrombosis. *Thromb Haemost*. 1999; 507a (abstract).
71. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 10739-45.
72. Eriksson P, Kallin B, van't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 1851-5.
73. Eriksson P, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A. Very-low-density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 20-6.
74. Stegnar M, Uhrin P, Peternel P, Mavri A, Salobir-Pajnic B, Stare J *et al.* The 4G/5G sequence polymorphism in the promoter of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene: relationship to plasma PAI-1 level in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1998; 79: 975-9.
75. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation* 1997; 95: 59-62.
76. Akar N, Yilmaz E, Akar E, Avcu F, Yalcin A, Cin S. Effect of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish deep vein thrombotic patients with and without FV1691 G-A. *Thromb Res* 2000; 97: 227-30.
77. Zöller B, García de Frutos P, Dählback B. A common 4G allele in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene as a risk factor for pulmonary embolism and arterial thrombosis in hereditary protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1998; 79: 802-7.
78. Spek CA, Koster T, Rosendaal FR, Bertina RM, Reitsma PH. Genotypic variation in the promoter region of the protein C gene is associated with plasma protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 214-8.
79. Aiach M, Nicaud V, Alhenc-Gelas M, Gandrille S, Arnaud E, Amiral J *et al.* Complex association of protein C gene promoter polymorphism with circulating protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1573-6.
80. Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Buil A, Faure A *et al.* A Quantitative-Trait Locus in the Human Factor XII Gene Influences Both Plasma Factor XII Levels and Susceptibility to Thrombotic Disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 567-74.
81. Ceelie H, Bertina RM, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Vos HL. Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb Haemost* 2001; 85: 1066-70.
82. Leroy-Matheron C, Duchemin J, Levent M, Gouault-Heilmann M. Genetic modulation of plasma protein S levels by two frequent dimorphisms in the PROS1 gene. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1088-92.
83. den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH *et al.* Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 759-62.
84. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 74: 1049-57.
85. González-Ordóñez AJ, Medina Rodríguez JM, Fernández Álvarez CR, Sánchez García J, Fernández Carreira JM, Álvarez MV *et al.* Reducción de concentraciones elevadas de homocisteína con ácido fólico y vitaminas B en pacientes con tromboembolia venosa: relación entre respuesta y genotipo C677T de la metilén tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). *Med Clin (Barc)* 2000; 114: 7-12.
86. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-3.
87. Brattström L, Wilcken DE, Öhrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 1998; 98: 2520-6.
88. Kluijtmans LA, den Heijer M, Reitsma PH, Heil SG, Blom HJ, Rosendaal FR. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase and factor V Leiden in the risk of deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1998; 79: 254-58.
89. Dilley A, Austin H, Hooper WC, Lally C, Ribeiro MJ, Wenger NK *et al.* Relation of three genetic traits to venous thrombosis in an African-American population. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 30-35.
90. Philipp CS, Dilley A, Saidi P, Evatt B, Austin H, Zawadzky J *et al.* Deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene as a thrombophilic risk factor after hip arthroplasty. *Thromb Haemost* 1998; 80: 869-73.
91. González-Ordóñez AJ, Fernández Carreira JM, Medina Rodríguez JM, Martín Sánchez L, Álvarez Díaz R, Álvarez MV *et al.* Risk of venous thromboembolism associated with the insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene. *Blood Coagul Fibrinol* 2000; 11: 485-90.

92. Hooper WC, Lally C, Austin H, Benson J, Dilley A, Wenger NK *et al.* The relationship between polymorphisms in the endothelial cell nitric oxide synthase gene and the platelet GPIIIa gene with myocardial infarction and venous thromboembolism in African Americans. *Chest* 1999; 116: 880-6.
93. Ordóñez AJ, Carreira JM, Franco AG, Sánchez LM, Álvarez MV, García EC. Two expressive polymorphisms on the endothelial nitric oxide synthase gene (intrón 4, 27 bp repeat and -786 T/C) and the venous thromboembolism. *Thromb Res* 2000; 99: 563-6.
94. Moyer MP, Tracy RP, Tracy PB, van't Veer C, Sparks CE, Mann KG. Plasma lipoproteins support prothrombinase and other procoagulant enzymatic complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 458-65.
95. Rota S, McWilliam NA, Baglin TP, Byrne CD. Atherogenic lipoproteins support assembly of the prothrombinase complex and thrombin generation: modulation by oxidation and vitamin E. *Blood* 1998; 91: 508-15.
96. Griffin J, Kojima K, Banka CL, Curtiss LK, Fernández JA. High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *J Clin Invest* 1999; 103: 219-27.
97. Fernández JA, Kojima K, Petaja J, Hackeng TM, Griffin JH. Cardiolipin enhances protein C pathway anticoagulant activity. *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26: 115-23.
98. Deguchi H, Fernández JA, Pabinger I, Heit JA, Griffin JH. Plasma glucosylceramide deficiency as potential risk factor for venous thrombosis and modulator of anticoagulant protein C pathway. *Blood* 2001; 97: 1907-14.
99. von Depka M, Nowak-Gottl U, Eisert R, Dieterich C, Barthels M, Scharrer I *et al.* Increased lipoprotein (a) levels as an independent risk factor for venous thromboembolism. *Blood* 2000; 96: 3364-8.
100. Griffin JH, Deguchi H, Fernández JA. Causes of thrombophilia yet to be discovered: a personal view. *Haemostasis* 2000; 30 (suppl 2): 26-33.
101. van Aken BE, den Heijer M, Bos GM, van Deventer SJ, Reitsma PH. Recurrent venous thrombosis and markers of inflammation. *Thromb Haemost* 2000; 83: 536-9.
102. Lindqvist PG, Svensson PJ, Dahlbäck 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.
103. Corral J, Iniesta JA, González-Conejero R, Villalón M, Vicente V. Polymorphisms of clotting factors modify the risk for primary intracranial hemorrhage. *Blood* 2001; 97: 2979-82.
104. Heijmans BT, Westendorp RG, Knook DL, Klufft C, Slagboom PE. The risk of mortality and the factor V Leiden mutation in a population-based cohort. *Thromb Haemost* 1998; 80: 607-9.
105. Gopel W, Ludwig M, Junge AK, Kohlmann T, Diedrich K, Moller J. Selection pressure for the factor-V-Leiden mutation and embryo implantation. *Lancet* 2001; 358: 1238-9.
106. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
107. Walker ID, Greaves M, Preston FE. Guidelines on the investigation and management of heritable thrombophilia. *Br J Haematol* 2001; 114: 512-28.
108. Cambien F, Poirier O, Nicaud V, Herrmann SM, Mallet C, Ricard S *et al.* Sequence diversity in 36 candidate genes for cardiovascular disorders. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 183-91.
109. Dutton G. Computational genomics: the medicine of the future?. *Ann Intern Med* 1999; 131: 801-4.
110. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
111. Sherlock G, Hernández-Boussard T, Kasarskis A, Binkley G, Matese JC, Dwight SS *et al.* The Stanford Microarray Database. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 152-5.