

Evolución de los procedimientos diagnósticos de la patología del sistema hemostático: del tiempo de coagulación a la medicina ómica

V. VICENTE

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

Introducción

El desarrollo en el conocimiento del sistema hemostático, al igual que ha sucedido en las diferentes parcelas de la medicina, ha venido de la mano, en gran medida, de la aplicación de nueva tecnología aplicada a la identificación y caracterización de los problemas hemorrágicos y, años más adelante, de los problemas trombóticos. Durante algunas décadas surgieron pruebas diagnósticas cuyo fundamento estaba basado, fundamentalmente, en la “cuantificación” de la activación del sistema hemostático y, para ello, se medía el tiempo de formación del trombo de fibrina *in vitro*, tras la adición al plasma de distintos activadores del sistema de coagulación. Esta primera época, que podemos definir estrictamente como “coagulativa”, se fue enriqueciendo con el advenimiento de los verdaderos motores responsables en el crecimiento de la metodología diagnóstica de la medicina moderna, que podemos identificar en varias etapas separadas en sus inicios, pero coincidentes en buena parte en su desarrollo: la química proteica, la inmunología, la biología celular y molecular y la medicina ómica.

Junto con el despliegue de la fase “coagulativa”, los años setenta fueron testigos del crecimiento de la química proteica y la inmunología, que aportaron un enriquecimiento muy notable del laboratorio médico. Los años ochenta presenciaron la automatización y estandarización de los laboratorios de hemostasia, así como el nacimiento de la biología celular y molecular como herramientas diagnósticas, aportando bases sólidas en el proceder diagnóstico de la medicina. Poder contar con esa metodología ha propiciado que en la última década hayamos vivido una auténtica explosión tecnológica en el ámbito de lo que se viene denominando “medicina ómica” (genómica, transcritoómica, proteómica, metabolómica, glicómica, etc.), áreas en continuo y rápido crecimiento, y que hace difícil hacer predicciones.

Todo lo acontecido ha incidido en la forma de entender la enfermedad y también está modificando los procedimientos diagnósticos, lo que posiblemente nos llevará a plantearnos una nueva forma de hacer en el futuro inmediato.

No es nuestra intención en estas páginas hacer un repaso exhaustivo de la evolución de los procedimientos diagnósticos en el campo de hemostasia y

la trombosis. Nuestra tarea se centrará en comentar los aspectos que hemos podido vivir en nuestros laboratorios, impulsados por la necesidad de nuevos procedimientos para poder realizar un mejor diagnóstico que, a nuestro juicio, han incidido y contribuido al cuidado y la prevención de las diátesis hemorrágicas y la enfermedad tromboembólica. Abordaremos esta tarea analizando esas “eras” establecidas por el avance tecnológico (Tabla 1).

Era coagulativa

El estudio del sistema hemostático vino impulsado por varios intereses. En primer lugar, para intentar aclarar las causas de las diátesis hemorrágicas congénitas severas. Su estudio propició la identificación de proteínas que formaban parte de un sistema del que se disponía de muy poca información, lo que poco a poco ayudó a establecer el diseño de interacción de proteínas del sistema hemostático y la elaboración de la “catarata de la coagulación sanguínea”. No nos detendremos en este apartado donde hay recientes y muy completas revisiones⁽¹⁻⁵⁾.

Un segundo aspecto perseguido en este periodo era poder contar con pruebas de laboratorio que tuviesen un valor predictivo de riesgo hemorrágico y que pudiesen ser aplicadas de forma sencilla en el laboratorio clínico. Más adelante, el objetivo se fue ampliando, pues también se perseguía establecer el diagnóstico de estados de hipercoagulabilidad, así como la detección y caracterización de estados de trombofilia hereditaria y adquirida.

Las herramientas iniciales de trabajo en la “era coagulativa” fueron rudimentarias, como el tiempo de coagulación, el tiempo de coagulación activado⁽⁶⁾ y el tiempo de protrombina⁽⁷⁾. Más adelante fueron incorporándose técnicas más complejas con la intención de incrementar su precisión, teniendo un especial protagonismo en esta parcela la escuela de Oxford, de donde surgió, entre otros, el test de generación de tromboplastina (TGT)⁽⁸⁾, la dosificación de proteínas de la coagulación en uno o dos tiempos, la identificación de inhibidores de factores de coagulación, la detección del anticoagulante lúpico, etc.^(1,2,4,9). Si bien estas técnicas servían para identificar deficiencias de proteínas del sistema hemostático, ya desde su aplicación en el laboratorio clínico venían acompañadas

Tabla 1. Evolución de la metodología diagnóstica en el estudio de la patología del sistema hemostático

Era coagulativa	
a.	Época inicial (desde el primer tercio de siglo XX): tiempos de coagulación, protrombina y tromboplastina, test de generación de tromboplastina, tromboelastografía, test de las 3P, monómeros de fibrina, detección de inhibidores, inhibidor lúpico, dosificación de factores de coagulación en uno y dos pasos, etc.
b.	Desde los años ochenta: automatización y estandarización. Introducción de los coagulómetros automáticos, INR, dosificación de inhibidores –proteínas C y S, antitrombina–, incorporación de sustratos cromogénicos –actividad anti-IIa y anti-Xa–, estudios de complejos trombina-antitrombina, etc.
c.	Desde los años noventa: resistencia a la proteína C, mejora del estudio del inhibidor lúpico, test de generación de trombina, nuevas pruebas para el control de los nuevos anticoagulantes orales –Hemoclot®, ecarina...–, etc.
Era del inmunoensayo	
a.	Años sesenta y setenta: inmunodifusión doble de Ouchterlony, inmunodifusión radial de Mancini, inmunoelectroforesis, electroforesis en geles de acrilamida, electroinmunodifusión de Laurell, radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoradiométrico (IRMA), electroforesis bidimensional, etc.
b.	Años ochenta y noventa: <i>Western blot</i> , inmunoprecipitación, enzimoimmunoanálisis (ELISA), pruebas de aglutinación de látex, estudio de multímeros de Fw, etc.
c.	Desde los años noventa: mejoras en los procedimientos electroforéticos, estudio de micropartículas, quimioluminiscencia, nanotecnología, proteómica, etc.
Era de la biología molecular	
a.	Desde los años ochenta: estudio de mutaciones y polimorfismos genéticos. <i>Southern blot</i> , estudio de fragmentos de restricción, múltiples amplificaciones e hibridaciones de sonda, etc.
b.	Desde los años noventa: inicio de la farmacogenética, estudios postraduccionales, medicina ómica (GWAS, estudio de micro-ARN, etc.).
Estudio de plaquetas	
Estudio de frotis de sangre periférica, tiempo de hemorragia, pruebas de agregación y aglutinación plaquetaria, estudio de adhesión a diferentes superficies, electroforesis de membrana plaquetaria, citometría de flujo, microscopía electrónica, aplicación de procedimientos simplificados en la cercanía del enfermo –PFA-100®, VerifyNow®, Impact®, Ultegra®, VASP, tromboelastografía, ...– etc.	

de dudas y críticas a su rentabilidad, que se mantendrán con el paso de los años^(10,11).

Curiosamente, ya a mediados de siglo pasado surgió una prueba que medía la formación “a tiempo real” del coágulo, la tromboelastografía⁽¹²⁾, y hace una década aproximadamente ha vuelto a resurgir en ambientes especialmente relacionados con la anestesiología, si bien la utilidad y aplicabilidad clínica de la tromboelastografía sigue en discusión⁽¹³⁾.

En los años sesenta también se inició la búsqueda de pruebas de laboratorio que ayudasen a establecer estados de hipercoagulabilidad, como el test de las 3P (*plasma protamine paraprotein*)⁽¹⁴⁾. La nueva metodología, por desgracia, se veía acompañada de la falta absoluta de automatización en los laboratorios de coagulación.

Dentro de las pruebas coagulativas, merece una especial atención la incorporación del INR (*international normalized ratio*) en los años ochenta, que ayudó de forma rotunda a estandarizar y mejorar el control de la terapia anticoagulante con antivitaminas K⁽¹⁵⁾. Actualmente estamos viviendo el inicio del cambio de los fármacos utilizados en la terapia anticoagulante oral, vigentes durante más de 50 años. Han aparecido los nuevos anticoagulantes orales, que han mostrado un magnífico nivel de seguridad y eficacia^(16,17), y su apli-

cación generalizada en la prevención de complicaciones tromboembólicas en patología de alta frecuencia, como es la fibrilación auricular, no tardará en asentarse. Una gran ventaja de los nuevos fármacos es la no necesidad de controles biológicos. Sin embargo, se están desarrollando nuevas pruebas coagulativas que puedan ayudarnos en situaciones específicas o complejas, como ante una insuficiencia renal o la aparición de una complicación hemorrágica o trombótica en pacientes en tratamiento con los nuevos fármacos^(18,19).

En los años ochenta, el estudio de familias con tendencia relevante a sufrir episodios trombóticos en territorios venosos impulsó el descubrimiento de un nuevo sistema anticoagulante, el de la proteína C (PC). La deficiencia de las proteínas que forman parte de ese sistema, como la PC y su cofactor, la proteína S, se identificaron como nuevos estados trombofílicos. El estudio de las proteínas C y S se incorporó, junto a la dosificación de la actividad anticoagulante de la antitrombina (AT), como nuevos y útiles parámetros coagulativos con capacidad de detectar estados de trombofilia hereditaria^(20, 21). Los hallazgos hicieron concebir la trombofilia hereditaria como enfermedad monogénica; sin embargo, una década más tarde asistiremos, gracias especialmente a la incorpo-

ración de la herramienta de la biología molecular en el diagnóstico de los estados trombofílicos, a entender esta patología como enfermedad poligénica^(22,23). Pero, sin duda, el gran avance vivido en la década de los ochenta, como hemos indicado previamente, fue la generalización de la automatización y estandarización de las pruebas de coagulación en los laboratorios de trombosis y hemostasia, con la incorporación a los laboratorios clínicos de coagulación de los coagulómetros versátiles y de alta precisión.

Posiblemente, la última prueba “coagulativa” con carácter innovador, que fue incorporada a mitad de los años noventa de forma generalizada en los laboratorios clínicos de coagulación, ha sido la determinación biológica de la resistencia a la PC activada⁽²⁴⁾, a la que también se suman las continuas modificaciones para mejorar las técnicas coagulativas que persiguen mejorar la sensibilidad y especificidad del anti-coagulante lúpico⁽²⁵⁾.

Las técnicas coagulativas, como hemos indicado basadas en la determinación del tiempo de formación del coagulo de fibrina, se vieron complementadas desde el inicio de los años ochenta con técnicas enzimáticas o pruebas de sustratos cromogénicos, metodología aún plenamente vigente y automatizada.

Era del inmunoensayo

En los años sesenta y setenta se fueron introduciendo en los laboratorios clínicos las técnicas relacionadas y utilizadas en el campo de la química proteica. El mejor conocimiento de las propiedades electroforéticas de las proteínas y la obtención de un buen número de anticuerpos policlonales facilitaron el camino. Pruebas tan sencillas como la inmunodifusión doble de Ouchterlony⁽²⁶⁾, la inmunodifusión radial de Mancini⁽²⁷⁾, la inmunoelectroforesis y contra-inmunoelectroforesis, etc., posibilitaron la determinación antigénica

de las proteínas de la coagulación, pudiendo confrontar y comparar su contenido antigénico en el plasma con su verdadera actividad coagulativa. Ello se vio aún más facilitado con la inmunoelectroforesis cuantitativa de Laurell⁽²⁸⁾ y con el estudio de las movilidades electroforéticas de las proteínas utilizando la inmunoelectroforesis cruzada antígeno-anticuerpo, metodologías que permitieron, entre otras muchas cosas, diferenciar la hemofilia A y la enfermedad de von Willebrand (EvW), identificar formas variantes de proteínas que se presumían deficientes en el plasma al perder o disminuir su actividad coagulante –las formas tipo II de la deficiencia de la AT, PC, etc.–, verificar anomalías de gammacarboxilación de proteínas vitaminas K-dependientes cuando se realizaba una electroforesis cruzada en presencia de calcio, etc.⁽²⁹⁻³³⁾.

Se aumentó la sensibilidad de las pruebas con la utilización de material radiactivo (antígeno o anticuerpo), pudiendo cuantificar pequeñas cantidades de proteínas circulantes con el radioinmunoensayo (RIA), anomalías cuantitativas/cualitativas de las proteínas de coagulación con el ensayo inmunoradiométrico (IRMA), o “afinando” trastornos de mo-

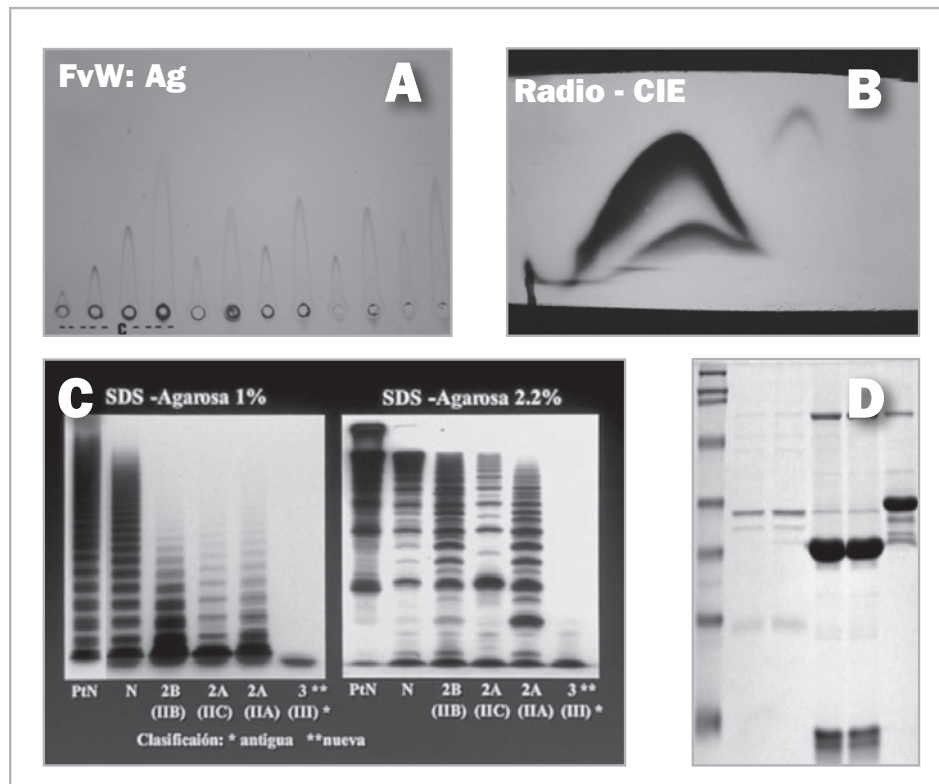


Figura 1. A. Cuantificación del factor de von Willebrand (FvW) por electroinmunodifusión de Laurell. B. Inmunoelectroforesis cruzada antígeno-anticuerpo del antígeno del FvW, en muestra plasmática obtenida antes y después de desmopresina (DDAVP). C. Estudio de composición multimérica del FvW en muestras de pacientes con diferentes variantes de la EvW (Fotografía del Fondo de Imagen en hematología de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia –SEHH–. Fotografía cedida por J. Batlle, S. Noya y M. F. López). D. Electroforesis en muestra en gel de acrilamida (SDS-PAGE).

vilidad electroforética utilizando la electroforesis cruzada antígeno-anticuerpo (Radio-CIE)⁽³⁴⁻³⁶⁾ (Figura 1). Igualmente, ha servido para poder investigar la capacidad de captación y secreción de diferentes sustancias, como la serotonina, por parte de las plaquetas⁽³⁷⁾

La obtención de los anticuerpos monoclonales supuso en toda la medicina un notabilísimo avance, mejorando las posibilidades del diagnóstico biológico. Se dio un salto cualitativo de gran importancia en cuanto a la sensibilidad y especificidad de las técnicas electroforéticas, que permitieron, aplicando tecnología como el *Western blot*, identificar pequeñas cantidades de proteínas presentes en membranas celulares o en el plasma^(38,39). De especial relevancia fue el estudio de la distribución de los multímeros del Factor de von Willebrand (FvW), que han servido para poder establecer la clasificación de la EvW^(40,41). La utilización de los anticuerpos monoclonales en la citometría de flujo nos permitió identificar y hasta cuantificar el número de receptores presentes en la superficie celular, lo que ha supuesto un paso muy notable para simplificar el diagnóstico y caracterización de las trombotopatías congénitas (ver más adelante).

Si bien las técnicas que utilizaban isótopos radiactivos supusieron un paso adelante en el desarrollo tecnológico y aplicación metodológica en el diagnóstico de laboratorio de hemostasia y trombosis, fue mucho más decisivo la sustitución de estas técnicas por las de enzimoimmunoanálisis (ELISA) y por tecnologías de inmunoensayo basadas en aglutinación de látex, evitando las limitaciones y el peligro del uso de los isótopos radiactivos⁽⁴²⁾. Esta metodología se encuentra hoy en día totalmente automatizada en muchos laboratorios de hemostasia, empleándose para fines distintos, como la detección de deficiencias de coagulación –antígeno del FvW (FvW:Ag), antígeno de la subunidad “a” del factor XIII, de la proteasa activadora del factor VII (FSAP), etc.–, para ayudar en el diagnóstico del tromboembolismo venoso –dímero D–, marcadores de hipercoagulabilidad –fragmento 1 + 2 de la protrombina (F1+2), complejos T-AT, etc.–, anticuerpos antifosfolípidos –anticardiopina o β 2-glicoproteína I (β 2-GPI)–, complejo heparina/factor 4 plaquetario para el diagnóstico de trombocitopenia inducida por heparina, etc.⁽⁴²⁾. Menor implantación tienen actualmente las técnicas de quimioluminiscencia basadas en inmunoensayos, pero es factible su presencia en los laboratorios en un breve periodo de tiempo, lo que permitirá cuantificar muy pequeñas cantidades del parámetro estudiado.

Durante años, numerosos marcadores como los complejos T-AT, el F1+2 de la protrombina, el monómero de fibrina, etc., se utilizaron para ver si podían ser buenos marcadores de hipercoagulabilidad. Sin embargo, con el paso de los años se mantiene aún

la duda de si la variación en esos parámetros refleja verdaderamente la causa del estado protrombótico o son meramente coincidencia o consecuencia de la situación clínica. Este capítulo no está ni mucho menos cerrado, y recientemente hemos comprobado cómo el nivel plasmático de una proteína “clásica” como es el FvW, marcador reconocido desde hace años de daño endotelial, ha sido definido como un factor de riesgo independiente de efecto adverso –hemorrágico y/o trombótico– en pacientes anticoagulados por fibrilación auricular⁽⁴³⁾. Actualmente se está indagando la estrategia del estudio de multimarcadores simultáneos, incluyendo parámetros de inflamación, como camino para obtener información clínica útil de riesgo protrombótico⁽⁴⁴⁾.

Nos gustaría finalizar este apartado señalando que estamos en los albores de poder contar con nuevas aproximaciones metodológicas de gran utilidad, con aplicaciones no sólo diagnósticas, sino también terapéuticas, dentro de un área que se encuentra en pleno desarrollo como es la nanomedicina⁽⁴⁵⁾. Sin duda, la nanotecnología, herramienta de la nanomedicina, podrá aportar información muy sensible y específica en el diagnóstico de muchas enfermedades desde una perspectiva molecular, y ahí obviamente estarán incluidas las que afectan al sistema hemostático, que ya cuentan con algunos resultados⁽⁴⁶⁾.

Evolución en el estudio de la función plaquetaria

Realmente, la primera prueba aplicada para el estudio de la fase tradicionalmente conocida en el sistema hemostático como “hemostasia primaria” ha sido el tiempo de hemorragia (TH)⁽⁴⁷⁾. Aunque el TH es un test fisiológicamente relevante, su realización, pese a los esfuerzos para lograr su estandarización, tiene una serie de problemas, que incluye su falta de especificidad y sensibilidad, la alta variabilidad dependiendo de la experiencia de la persona que realiza la prueba, la frecuente formación de cicatrices en las zonas donde se realiza el corte, etc. Ello ha llevado a que el TH no sea una prueba recomendada para el estudio rutinario de la función plaquetaria, si bien ha tenido su utilidad en la investigación del efecto terapéutico de productos como la desmopresina (DDAVP) y en el diagnóstico y seguimiento de la EvW⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾.

El test clásico para el estudio del funcionalismo plaquetario es el estudio de agregometría, desarrollado al inicio de los años sesenta^(52,53). Pese al paso de los años, es una prueba que adolece de una adecuada estandarización⁽⁵⁴⁾, manteniendo su valor como prueba diagnóstica en determinadas trombotopatías hereditarias, como el síndrome de Bernard-Soulier (SBS),

la tromboastenia de Glanzmann (TG) o el tipo 2B de la EvW, patologías que suelen presentar un patrón de agregación característico^(37,55-57). En los años setenta, el estudio de la aglutinación plaquetaria con el antibiótico ristocetina sirvió para establecer una mayor diferencia biológica entre la hemofilia A y la EvW⁽⁵⁸⁾.

El estudio de agregación plaquetaria con los diferentes agonistas –ADP, adrenalina, colágeno, ácido araquidónico, etc.– no ha sido útil para identificar de forma rutinaria situaciones de incrementado riesgo vascular –hiperreactividad plaquetaria– o incluso para poder ser una prueba recomendada en el control de la terapia antiagregante^(56,59).

Como hemos señalado previamente, la citometría de flujo se ha convertido en una herramienta de primera magnitud en el diagnóstico de anomalías cuantitativas o cualitativas de las glicoproteínas de membrana plaquetaria, como es el complejo glicoproteína GP Ib-IX-V –SBS–, o del complejo GP IIb-IIIa –TG–. Estas pruebas se han hecho más accesibles que los estudios de *Western blot* o inmunoprecipitación, que en numerosas ocasiones se requerían para poder establecer el diagnóstico certero de esas raras trombotopatías^(59,59-63). Igualmente, la citometría de flujo es una buena prueba para cuantificar el número de ligandos de los diferentes receptores de membrana plaquetaria, identificar situaciones donde hay activación plaquetaria, diagnosticar anomalías de gránulos plaquetarios, etc.⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾.

En los últimos diez años hemos asistido a diferentes intentos de incorporar nueva metodología que hiciese abordable el estudio de la función plaquetaria, especialmente en pacientes tratados con diferentes antiagregantes plaquetarios. Se han utilizado equipos de diferentes generaciones, como el analizador de función plaquetaria 100 (PFA-100®), el sistema VerifyNow®, Impact®, Ulterga® y nuevas metodologías como la técnica de fosforilación VASP y la tromboelastografía, entre otras^(13,56,57). En el momento actual solamente se puede indicar para todas ellas que siguen siendo herramientas que deben ser utilizadas en el ámbito de los ensayos y la investigación, no estando recomendado su uso indiscriminado en la clínica diaria para control de la terapia antiagregante^(56,59).

Finalmente, se debe indicar que, aunque es una prueba morfológica y no funcional, el estudio de microscopía electrónica es de utilidad, especialmente en trombotopatías donde existe una alteración de los gránulos plaquetarios^(64,67).

En definitiva, sigue existiendo una importante necesidad de mejorar y contar con nueva metodología que aumenten la sensibilidad y especificidad para establecer de forma adecuada la correlación del estado del funcionalismo plaquetario y el riesgo clínico. Las nuevas técnicas que acabamos de mencionar, aunque

en términos generales han simplificado y automatizado los procedimientos, no han podido ser validadas de forma plenamente aceptada para la rutina clínica y remplazar los estudios clásicos de agregación plaquetaria.

Era de la biología molecular

Si bien la era de la biología molecular desde que nace no ha tenido interrupción, podemos diferenciar dos periodos en medicina. El primero de ellos se caracteriza por ser el de la identificación de las mutaciones y polimorfismos genéticos y la búsqueda de su asociación a la presencia o riesgo de padecer una determinada patología. El estudio de los polimorfismos genéticos hizo que apareciera la farmacogenética, donde se comprueba que la presencia de diferentes variantes moleculares comunes condiciona distintas respuestas a fármacos. A esta primera fase le sigue el periodo de la medicina genómica que, a su vez, forma parte de uno de los diferentes compartimentos que han dado nombre a la denominada medicina *ómica*. Haremos referencia a las principales características de cada uno de esos periodos.

Mutaciones genéticas

Es a mitad de los años ochenta cuando verdaderamente la metodología aplicada al diagnóstico de enfermedades monogénicas empieza a desarrollarse. Con aplicaciones muy distintas y bastante más rudimentarias que con las que contamos hoy en día, en 1983 se abre el campo de la caracterización molecular de los estados de trombofilia hereditaria, pues se identifica la primera mutación en el gen de la AT asociada a riesgo trombótico⁽⁶⁸⁾. La identificación molecular de este tipo de anomalías monogénicas se realiza partiendo del ADN genómico de células mononucleares de sangre periférica del paciente. Los primeros estudios empleaban el método de *Southern blot*, que permitía identificar grandes deleciones/inserciones o mutaciones que causaban polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)⁽⁶⁹⁾. En la última década, se han desarrollado sistemas de análisis más sensibles y sencillos, como el de múltiples amplificaciones e hibridaciones de sondas (MLPA), que permiten identificar grandes deleciones o inserciones. Sin embargo, el mayor avance en la identificación de anomalías monogénicas fue posible con el desarrollo del método Sanger de secuenciación en la década de los ochenta, especialmente aplicado a muestras amplificadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que permite detectar la mayoría de las mutaciones en deficiencias de AT, PC y S.

La aplicación de esta herramienta diagnóstica ha sido de utilidad también para la caracterización molecular de un amplio número de coagulopatías y trombopatías congénitas⁽²²⁾. El desarrollo de los secuenciadores y la disponibilidad de servicios centrales en grandes hospitales y universidades ha reducido de forma significativa el coste y tiempo de estos procedimientos, y supone un punto de apoyo y colaboración importante a los laboratorios de hemostasia, lo que permite extender de forma casi generalizada esta metodología. Podemos verificar cómo desde hace años los laboratorios españoles están siendo muy activos en la caracterización de numerosas anomalías moleculares que definen diferentes coagulopatías congénitas⁽⁷⁰⁻⁷²⁾, inhibidores de la coagulación que dan lugar a trombofilia^(69,73,74) y trombopatías congénitas^(75,76).

También, recientemente se han caracterizado raras anomalías moleculares como la primera deficiencia homocigota del cofactor II de la heparina⁽⁷⁷⁾ y se ha conseguido mejorar la definición clínico-biológica-molecular del estado trombofílico asociado a alteraciones de la AT^(78,79). La caracterización molecular de todas las anomalías está siendo decisiva para poder entender mejor la relación estructura-función de gran parte de las proteínas del sistema hemostático –correlación fenotipo-genotipo–, lo que ha facilitado entender, hace ya algunos años, la aparición de inhibidores en algunos pacientes hemofílicos que padecían una anomalía molecular específica, o la diferente expresión clínico-biológica de una misma enfermedad, como ha sido recientemente indicado en el SBS⁽⁸⁰⁾.

Por otra parte, el conocimiento que aportan los estudios moleculares de nuestros pacientes nos proporcionan nuevas hipótesis y sospechas de diferentes mecanismos de enfermar. En concreto, en nuestro laboratorio el estudio de mutantes naturales de la AT, como la AT Murcia (K241E), sugiere la existencia de mecanismos adicionales postraducionales que llevan a la deficiencia funcional de la proteína, pudiendo condicionar una glicosilación alterada⁽⁸¹⁾. O la sensibilidad conformacional de proteínas hemostáticas para explicar el desarrollo de trombosis, tanto en situaciones hereditarias como adquiridas^(83,82-87).

Polimorfismos genéticos

Al inicio de la última década del pasado siglo, se comienza a estudiar la relevancia clínica de las 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 un polimorfismo. Se comprueba que más

del 90% de los polimorfismos son sustituciones de un nucleótido por otro, por lo que se denominan SNP (*single nucleotide polymorphism*). Los demás polimorfismos son pequeñas inserciones o deleciones de una a varias decenas de nucleótidos. El interés que despierta el estudio de los SNP en los diferentes campos de la medicina ha sido enorme, por la posible vinculación que pueden tener en la manifestación de un determinado fenotipo. El campo del sistema hemostático no escapa a ese interés, especialmente en la búsqueda de asociación entre el riesgo trombotico y el hemorrágico⁽⁸⁸⁻⁹⁰⁾.

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⁽⁹¹⁻⁹³⁾, y nos han enseñado que determinados polimorfismos justifican los diferentes niveles plasmáticos de factores de coagulación como el fibrinógeno, el Factor VII y el XII^(94,95), así como pueden afectar la expresión y función de receptores adhesivos plaquetarios^(65,66,96). Se han identificado una gran cantidad de polimorfismos de genes reguladores o modificadores de proteínas del sistema hemostático, inflamatorio, etc., todos ellos “candidatos” a definir riesgo trombotico o bien arterial o venoso^(65,66,96-99), e incluso otros que podrían disminuir el riesgo de enfermedad vascular arterial⁽¹⁰⁰⁻¹⁰⁴⁾. Contar con estos resultados y ver el efecto sinérgico que puede tener la asociación de varios polimorfismos ayudó a cambiar definitivamente el concepto de la trombofilia como enfermedad monogénica a trastorno multigénico y multifactorial⁽¹⁰⁵⁾.

Estudios realizados por el grupo del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, siguiendo una estrategia de “ligamiento” (estudio *GAIT*) ha permitido establecer la heredabilidad de un amplio número de proteínas del sistema hemostático⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾ e identificar lugares “calientes” de genes que hasta ahora no se habían relacionado con el sistema hemostático y que podrían participar en la definición de riesgo trombotico.

Indudablemente, los polimorfismos genéticos nos han ayudado a comprender un poco más las complejas interacciones genéticas del sistema hemostático donde, en definitiva, la interacción de determinados polimorfismos puede multiplicar el riesgo de trombosis^(109,110). Adicionalmente, también tenemos datos de cómo los polimorfismos considerados protromboticos pueden desempeñar un papel beneficioso frenando la aparición de complicaciones hemorrágicas^(102,111), o muestran cómo pueden interaccionar factores genéticos con otros ambientales⁽¹¹²⁾. En definitiva, toda la información acumulada en los últimos quince años nos ha ayudado a entender mejor la complejidad y el origen multigénico de la enfermedad tromboembólica⁽¹⁰⁵⁾.

Farmacogenética

Precisamente el conocimiento de la variabilidad genética de las proteínas implicadas en el mantenimiento del equilibrio hemostático nos ha permitido entender la gran heterogeneidad de la respuesta interindividual a fármacos antitrombóticos.

La farmacogenética es una nueva disciplina que estudia la influencia genética en la respuesta farmacológica⁽¹¹³⁾. Tiene como objetivo la posibilidad de actuar para prevenir los efectos adversos de drogas y la elección apropiada del tratamiento más eficaz para cada paciente en función de sus características genéticas, con la finalidad de conseguir una medicina personalizada. La caracterización en nuestros laboratorios de los diferentes perfiles genéticos de las enzimas que participan en el metabolismo de fármacos antitrombóticos, o de las dianas de dichos tratamientos, ha podido definir la posibilidad de mejora en eficacia y disminución de toxicidad de una terapia determinada^(114,115). En este mismo volumen hay un capítulo específico dedicado a este tema, por lo que no nos extenderemos en estos aspectos.

Hemos demostrado que determinadas variedades moleculares del citocromo P450, el complejo vitamina K epóxido reductasa 1 (VKORC1) y la caluménina, enzimas que participan en el metabolismo del acenocumarol, modulan el efecto anticoagulante de esa antivitamina K⁽¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾.

Por otra parte, las tienopiridinas, y en especial el clopidogrel, se emplean como antiagregantes de amplio uso en prevención de eventos cardiovasculares y su indicación es habitual tras la colocación de *stents* coronarios. Conocemos la existencia de una gran variabilidad interindividual a la respuesta al clopidogrel, pudiendo estar implicadas las enzimas que participan en su absorción y biotransformación. Los genes que codifican estas enzimas son polimórficos y se ha mostrado que determinadas variantes genéticas influyen en la bioactividad del clopidogrel. Las diferentes “sensibilidades” individuales al antiagregante podrían asociarse a la modificación del número de eventos cardiovasculares durante el primer año después de padecer un infarto de miocardio y comenzar el tratamiento con la tienopiridina⁽⁵⁹⁾. Sin embargo, no hay una recomendación de estudio farmacogenético al no existir evidencia plenamente aceptada de que estos datos puedan ayudar a predecir la respuesta terapéutica o a la elección de dosis del antiagregante.

La trombolisis es un tratamiento de elección en la fase precoz del infarto agudo de miocardio. Sin embargo, es conocido que la mitad de los pacientes tratados no alcanza una óptima perfusión o recanalización coronaria. El motivo de esta situación no está aclarado. Estudios farmacogenéticos en pacientes so-

metidos a terapia trombolítica sugieren que la sensibilidad del trombo puede estar en relación con el polimorfismo del Factor XIII Val34Leu⁽¹¹⁹⁾, pudiendo afectar la sensibilidad a la lisis la coexistencia de otros polimorfismos de diferentes proteínas de coagulación, o bien de niveles plasmáticos de algunos factores de coagulación^(120,121).

Todo ello está abriendo perspectivas innovadoras en la propia terapia antitrombótica, y la más que previsible simplificación tecnológica que facilite disponer del resultado inmediato de perfiles genéticos se puede convertir en una herramienta muy útil en los laboratorios de hemostasia implicados en el control de la terapia antitrombótica.

Medicina ómica

En el apartado anterior nos hemos referido a estudios que estrictamente están incluidos en lo que puede definirse como “Medicina Genómica”, pues hemos tratado de la identificación de variantes moleculares en la secuencia del ADN, que pueden afectar al riesgo de enfermedad tromboembólica y hemorrágica y pueden incluso determinar la efectividad individual de un determinado tratamiento. Sin embargo, podríamos incluir todos estos estudios dentro de una metodología casi artesanal o de bajo volumen de muestras. La genómica ha evolucionado en los últimos años a gran velocidad, lo que ha sido propiciado por el mejor conocimiento del propio genoma y de sus interacciones con factores no genómicos, tanto en situaciones de salud como de enfermedad, lo que ha facilitado la aparición de nuevas aproximaciones diagnósticas y terapéuticas utilizando herramientas que pueden analizar millones de parámetros⁽¹²²⁾. Algunas estrategias están siendo utilizadas con el objetivo de poder aportar información clínica.

Por otra parte, también desde hace algunos años la aplicación de la combinación de una doble tecnología, la electroforesis en dos dimensiones y la espectrometría de masa, ha sustentado el desarrollo de la proteómica y sus diferentes variedades con múltiples aplicaciones. Aunque el conocimiento acumulado en el campo que nos ocupa no es todavía muy importante, es indudable que está sirviendo para aportar conocimiento en diferentes áreas: en el proteoma plasmático y plaquetario, del mapeo proteico de los compartimentos subcelulares, de situaciones más específicas como del secretoma, modificaciones postraduccionales, así como del proteoma de las cascadas de transmisión de señales⁽¹²³⁻¹²⁵⁾. Es indudable que este campo tiene un futuro de gran interés y, muy posiblemente, dentro de no mucho podremos ver a la proteómica no solamente como una herramienta de investigación, sino que tengamos que utilizarla como

tecnología diagnóstica en los laboratorios avanzados de hemostasia y trombosis. Dado que la aplicación en la actualidad de la proteómica y otras variedades metodológicas, incluyendo la glicómica, la metabolómica, etc., no es factible, nos detendremos especialmente en tratar algunos aspectos puntuales relacionados con la genómica, cuyo uso ya se ha iniciado en la investigación de diferentes aspectos del sistema hemostático, como son los estudios de asociación empleando un amplio panorama del genoma (GWAS) y del papel de los micro-ARN (mARN) como moduladores del sistema hemostático.

Estudio GWAS (Genome-Wide Association Study)

Es una aproximación utilizada en investigación genética para buscar asociaciones entre millones de variaciones genéticas específicas, generalmente polimorfismos, con enfermedades concretas. Se han realizado más de 600 estudios de asociación en más de 150 enfermedades, habiéndose descrito cerca de 800 variaciones moleculares (SNP) de forma significativa ($p < 5 \times 10^{-8}$) entre modificación molecular y enfermedad⁽¹²⁶⁾. En los últimos años han surgido numerosos datos en el campo de la hemostasia y la trombosis.

Estudios de este tipo, donde generalmente se requiere una muestra grande de pacientes y tecnología no abordable en un sólo laboratorio –metodología de genómica, bioinformática, etc.– demanda la interacción de grupos y estudios de carácter multicéntrico y multidisciplinario. Recientemente, cuatro grupos españoles, utilizando esta aproximación y colaborando con otros grupos internacionales, han identificado la asociación del aneurisma de aorta abdominal con una determinada marca molecular (alelo A del rs7025486 que se encuentra en el 9q33, localizado dentro del gen DAB2IP, que codifica un inhibidor del crecimiento celular). A su vez, este alelo se asocia con infarto de miocardio prematuro, arteriopatía vascular periférica y embolismo pulmonar⁽¹²⁷⁾. De igual manera, nuestro grupo, en colaboración con otros, en un estudio realizado en niños ha podido identificar nuevos genes potencialmente relevantes en la función y biología plaquetaria⁽¹²⁸⁾.

Sin duda, estudios con tecnología GWAS orientarán a la búsqueda y estudio de nuevos genes que puedan estar implicados en la patogénesis de las alteraciones del sistema hemostático, lo que a su vez facilitará la incorporación de nuevos recursos terapéuticos.

Aunque la metodología GWAS es moderna, será posiblemente desplazada en breve por el desarrollo de la metodología de secuenciación de alto rendimiento, que permitirá en poco tiempo conseguir la secuencia completa del genoma de un paciente en

tiempo real y a precios competitivos⁽¹²⁹⁾. Las posibilidades diagnósticas, pronósticas y terapéuticas de esta nueva tecnología son apasionantes una vez superados los retos técnicos y bioinformáticos que todavía existen.

Micro-ARN (mARN)

El desarrollo de la genómica ha facilitado datos acerca de mecanismos reguladores de la funcionalidad del propio genoma. En los últimos años se ha atribuido también a los mARN ese papel. Los mARN son pequeñas moléculas de ARN de aproximadamente 22 nucleótidos que regulan los niveles y traducción del ARNm de otros genes y, por tanto, modulan los niveles de diferentes proteínas. Se ha comprobado un papel de los mARN en el desarrollo embrionario, diferenciación celular, apoptosis, etc., habiéndose relacionado con el mecanismo de diferentes enfermedades, especialmente del cáncer. Es por ello que actualmente se están diseñando y desarrollando pequeñas moléculas sintéticas que interfieren con el ARN (siARN) con potencial utilidad clínica⁽¹²²⁾. Recientemente, laboratorios clínicos están aportando datos de gran interés acerca del papel que juegan los mARN en el desarrollo y regulación del sistema hemostático⁽¹³⁰⁾, incluyendo datos preliminares de la regulación de la respuesta a la terapia antitrombótica con antivitaminas K.

No podemos finalizar sin referirnos a lo que se inició hace unos años y se ha convertido en un soporte muy relevante en el campo que estamos tratando, la “biología *in silico*”. El estudio de los sistemas biológicos, obviamente donde están incluidos los mecanismos de enfermar y la acción de los fármacos, seguirá incrementando su relación con los sistemas matemáticos y simulaciones informáticas. La información que se va consiguiendo es de notable interés desde diferentes perspectivas; desde la simulación de estructuras a las interacciones con proteínas o con sustancias químicas, etc. Esa información tendrá una amplia aplicabilidad en el nuevo laboratorio clínico, pues ya observamos como algunas de sus aportaciones pueden orientar el estudio para develar mecanismos de enfermar, procedimientos diagnósticos y diseño de nuevos fármacos, entre otras muchas posibilidades⁽¹³¹⁾.

Es indudable que en 50 años el cambio tecnológico ha enriquecido con nueva metodología el laboratorio de diagnóstico. La automatización, simplificación y abaratamiento de los nuevos procedimientos predicen una pronta incorporación a los laboratorios de hemostasia y trombosis, donde más que nunca se hará imprescindible adquirir una estructura multidisciplinaria y una mentalidad de colabora-

ción para poder ejercer de una forma adecuada y eficaz la función que están llamados a realizar.

Agradecimientos

A los doctores Javier Corral, María Luisa Lozano, José Rivera y Vanessa Roldán, por la lectura crítica del manuscrito y las sugerencias realizadas.

Referencias bibliográficas

- Davie EW. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. *J Biol Chem* 2003; 278: 50819-32.
- Diamond LK. A history of blood coagulation. En: *Blood pure and eloquent. A story of discovery, of people, and of ideas.* New York: Ed. Wintrobe MM. McGraw-Hill Book Company; 1980. pp. 659-90.
- Navarro JL, Aznar J, Rutllant M. Conmemoración de la historia de la SETH en su 25 Congreso. Madrid: Ed. Acción Médica, S.A.; 2009.
- Owen CA. A history of blood coagulation. Rochester, Minn.: Nichols WL, Bowie EJW (eds.), Mayo Foundation for Medical Education and Research; 2001.
- Saito H, Matsushita T, Kojima T. Historical perspective and future direction of coagulation research. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (Supl 1): 352-63.
- Hattersley PG. Activated coagulation time of whole blood. *JAMA* 1966; 196: 150-4.
- Quick AJ, Stanley-Brown M, Bancroft FW. A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. *Am J Med Sci* 1935; 190: 501-5.
- Biggs RM, Douglas AS. Test the thromboplastin generation. *J Clin Path* 1953; 6: 23-9.
- Margolius A, Jackson DP, Ratnoff OD. Circulating anticoagulants: a study of 40 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1961; 40: 145-202.
- Diamond LK, Porter FS. The inadequacies of routine bleeding and clotting times. *N Engl J Med* 1958; 259: 1025-7.
- Eckman MH, Erban JK, Singh SK, Kao GS. Screening for the risk for bleeding or thrombosis. *Ann Intern Med* 2003; 138: W15-24.
- Hartert H. Blutgerinnung studien mit der thromboelastographie, einen Neuen Untersuchungsverfahren. *Klin Wochenschr* 1948; 26: 577-83.
- Luddington RJ. Thrombelastography/thromboelastometry. *Clin Lab Haem* 2005; 27: 81-90.
- Seaman AJ. The recognition of intravascular clotting. The plasma protamine paracoagulation test. *Arch Intern Med* 1970; 125: 1016-21.
- Anonymous. Expert committee on biological standardization. Requirements for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1983; 33: 81-105.
- Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, et al.; RE-LY Steering Committee and Investigators. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009; 361: 1139-51.
- Patel MR, Mahafley KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011; 365: 883-91.
- Van Ryn J, Stangier J, Haertter S, Liesenfeld KH, Wienen W, Feuring M, Clemens A. Dabigatran etexilate-a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of coagulation assay and reversal of anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 2010; 103: 1116-27.
- Arcelus JI, Cairols M, Granero X, Jiménez D, Vicente Llau J, Monreal M, Vicente V. New oral anticoagulants: a multidisciplinary approach. *Med Clin* 2009; 133: 508-12.
- Tabernero MD, Tomás JF, Alberca I, Orfao A, López Borrasca A, Vicente V. Incidence and clinical characteristic of hereditary thrombophilia. *Am J Hematol* 1991; 36: 459-62.
- Vicente V, Lozano ML, Rivera J. Estados de hipercoagulabilidad. En: Rocha E (ed). *Tromboembolismo venoso.* Madrid: Editorial Médica Panamericana. Clínicas Médicas de España 1996; 3: 27-52.
- Vicente V, Lozano ML, Rivera J, González-Conejero R, Martínez C, Corral J. Bases moleculares de las diátesis hemorrágicas congénitas y estados de trombofilia primaria. En: González de Buitrago JM, Medina Jiménez JM (eds.). *Patología molecular.* Madrid: McGraw-Hill/Interamericana; 2001. pp. 193-216.
- Corral J, Vicente V. Biología molecular en hemostasia y trombosis: alteraciones monogénicas. En: Navarro JL, Aznar J, Rutllant M (eds.). *Conmemoración de la historia de la SETH en su 25 Congreso.* Madrid: Acción Médica, S.A.; 2009. pp. 97-101.
- Svensson PJ, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 330: 517-22.
- Devreese K, Peerlinck K, Hoylaerts MF. Diagnostic test combinations associated with thrombosis in lupus anticoagulant positive patients. *Thromb and Haemost* 2011; 105: 736-8.
- Ouchterlony G. Diffusion-in-gel method for immunological analysis. *Prog Allergy* 1962; 6: 30-154.
- Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965; 2: 235-54.
- Laurell CB. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal Biochem* 1966; 15: 42-52.
- Rocha E, Paramo JA, Bascones C, Fisac PR, Cuesta B, Fernandez J. Prothrombin Segovia: a new congenital abnormality of prothrombin. *Scand J Haematol* 1986; 36: 444-9.
- Rocha E, Lasierra J, Narvaiza MJ, Vilades E, Palacios E, Fernandez J. Fibrinógeno Logroño. A new case of congenital dysfibrinogenemia. *Ric Clin Lab* 1984; 14: 663-72.
- Vicente V, Maia R, Alberca I, Tamagnini GPT, López Borrasca A. Congenital deficiency of vitamin K-dependent coagulation factors and protein C. *Thromb Haemost* 1984; 51: 329-34.
- Vicente V, Alberca I, González R, Alegre A, Redondo C, Moro MJ. New congenital deficiency of high molecular weight kininogen and prekallikrein (Fitzgerald trait). Study of response to DDAVP and venous occlusion. *Haematologia* 1986; 19: 41-8.
- Corral J, Rivera J, Martínez C, González-Conejero R, Vicente V. Detection of conformational transformation of antithrombin in blood with crossed immunoelectrophoresis: new application for a classical method. *J Lab Clin Lab Med* 2003; 142: 298-305.
- Vicente V, Alberca I, López Borrasca A. Factor VIII-related antigen in cerebrospinal fluid. *Thromb Haemost* 2003; 49: 142-3.
- Vicente V, Coppola R, Mannucci PM. The role of the spleen in regulating the plasma levels of Factor VIII Von Willebrand's Factor after DDAVP. *Blood* 1982; 60: 1402-6.
- Vicente V, Alberca I, Calles I, Manso M, López Borrasca A. Coagulation proteins showing abnormal electrophoretic mobility in commercial concentrates of Factor VIII and prothrombin complex. *Haemostasis* 1984; 14: 453-9.
- Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* 2009; 94: 700-11.

38. Cheresch D, Berliner S, Vicente V, Ruggeri ZM. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell* 1989; 58: 945-53.
39. Ware J, Russell SA, Vicente V, Scharf RE, Tomer A, McMillan R, Ruggeri ZM. Nonsense mutation in the glycoprotein Ib a coding sequence associated with Bernard Soulier syndrome. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1990; 87: 2026-30.
40. Batlle J, López Fernández MF, Campos M, Justica B, Berges C, Navarro JL, et al. The heterogeneity of type IIA von Willebrand's disease: studies with protease inhibitors. *Blood* 1986; 68: 1207-12.
41. López-Fernández MF, Batlle J, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Secretion of von Willebrand factor from platelets. *Methods Enzymol* 1989; 169: 244-51.
42. Kappel A, Ehm M. Immunoassays for diagnosis of coagulation disorders. *Hämostasologie* 2010; 4: 194-201.
43. Roldán V, Marín F, Muiña B, Torregrosa JM, Hernández-Romero D, Valdés M, et al. Plasma von Willebrand factor levels are an independent risk factor for adverse events, mortality and major bleeding in anticoagulated atrial fibrillation patients. *J Am Coll Cardiol* 2011; Apr 11. [Epub ahead of print].
44. Roldán V, Jover E, Marín F. Marcadores biológicos en aterotrombosis. *Haematologica* 2010; 95 (Suppl. 1): 449-54.
45. Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanomedicine. *New Engl J Med* 2010; 363: 2434-43.
46. Lefferts JA, Jannetto P, Tsongalis GJ. Evaluation of the Nanosphere Verigene System and the verigene F5/MTHFR Nucleic Acid Test. *Exp Mol Pathol* 2009; 87: 105-8.
47. Michelson AD, Frelinger AL, Furman MI. Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol* 2006; 98 (Suppl. 10A): 4N-10N.
48. Vicente V, Alberca I, González R, López Borrasca A. DDAVP in a non-hemophilic patient with acquired Factor VIII inhibitor. *Br J Haematol* 1985; 60: 585-6.
49. Mannucci PM, Vicente V, Vianello R, Cattaneo M, Alberca I, Mari D. Controlled trial of desmopressin in liver cirrhosis and other conditions associated with prolonged bleeding time. *Blood* 1986; 67: 1148-53.
50. Cattaneo M, Tenconi PM, Alberca I, Vicente V, Mannucci PM. Subcutaneous desmopressin (DDAVP) shortens the prolonged bleeding time in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 1990; 64: 358-60.
51. Vicente V, Laso J, Moraleda JM, Estellés A, Aznar J. DDAVP and tachyphylaxis in healthy subjects. En: Mariani G, Mannucci PM, Cattaneo M (eds.). *Desmopressin in bleeding disorders*. New York: Plenum Publishing Corporation; 1993.
52. Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927-9.
53. O'Brien JR. Historical perspective and future directions in platelet research. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (Supl 1): 374-95.
54. Cattaneo M, Hayward CPM, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Boston (USA), 12 de julio, 2009.
55. Rivera J, Lozano ML, Corral J, González-Conejero R, Martínez C, Vicente V. The platelet GPIb/IX/V complex: physiological role. *J Physiol Biochem* 2000; 56: 355-66.
56. Hayward CPM, Eikelboom J. Platelet function testing: quality assurance. *Sem Thromb Hemost* 2007; 33: 273-82.
57. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Rev* 2005; 19: 111-23.
58. Howard MA, Sawers RJ, Firkin BG. Ristocetin: a means of differentiating von Willebrand's disease into two groups. *Blood* 1973; 41: 687-90.
59. Vicente V, Lozano ML, Roldán V, Rivera J. Resistencia y variabilidad en la respuesta a antiagregantes plaquetarios: diagnóstico, relevancia clínica y opciones terapéuticas. *Haematologica* 2009; 94 (Suppl. 1): 22-8.
60. González-Conejero R, Rivera J, Corral J, Acuña A, Guerrero JA, Vicente V. Biological assessment of aspirin efficacy on healthy individuals: heterogeneous response or aspirin failure? *Stroke* 2005; 36: 276-80.
61. Berndt MC, Andrews RK. Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica* 2011; 96: 355-9.
62. Rivera J, Lozano ML, Vicente V. Trombopatías congénitas. Bases moleculares y aspectos clínicos. En: San Miguel JF, Sierra J, Vicente V, Vives JL, Urbano A (eds.). *Hematología* Madrid: Arán Ediciones; 2003. pp. 353-68.
63. De Marco L, Mazzucato M, Fabris F, Roia D, Coser P, Girolami A, et al. Variant Bernard-Soulier syndrome type Bolzano: a congenital bleeding disorder due to a structural and functional abnormality of the platelet glycoprotein Ib-IX receptor. *J Clin Invest* 1990; 86: 25-31.
64. Corral J, González-Conejero R, Pujol-Moix N, Domenech P, Vicente V. Mutation analysis of HPS1, the gene mutated in Hermansky-Pudlak syndrome, in patients with isolated platelet dense-granules deficiency. *Haematologica* 2004; 89: 325-9.
65. 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.
66. Corral J, Lozano ML, González-Conejero R, Martínez C, Iniesta JA, Rivera J, Vicente V. A common polymorphism flanking the ATG initiator codon of GPIIb does not affect expression and is not a major risk for arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 2000; 83: 23-8.
67. González-Conejero R, Rivera J, Escolar G, Zuazu I, Vicente V, 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.
68. Prochownik EV, Markham AF, Orkin SH. Isolation of a cDNA clone for human antithrombin III. *J Biol Chem* 1983; 258: 8389-94.
69. Romeo G, Hassan HJ, Staempfli S, Roncuzzi L, Cianetti L, Leonardi A, et al. Hereditary thrombophilia: identification of non sense and missense mutations in the protein C gene. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1987; 84: 2829-32.
70. Vidal F, Farssac E, Altisent C, Puig L, Gallardo D. Rapid hemophilia A molecular diagnosis by a simple DNA sequencing procedure: identification of 14 novel mutations. *Thromb Haemost* 2001; 85: 580-3.
71. Corrales I, Ramírez L, Ayats J, Altisent C, Parra R, Vidal F. Integration of molecular and clinical data of 40 unrelated von Willebrand disease families in a Spanish locus-specific mutation database: first release including 58 mutations. *Haematologica* 2010; 95: 1982-4.
72. Casaña P, Cabrera N, Cid AR, Haya S, Beneyto M, Espinós C, et al. Severe and moderate hemophilia A: identification of 38 new genetic alterations. *Haematologica* 2008; 93: 1091-4.
73. García de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, Sala N. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost* 2007; 98: 543-56.
74. Soria JM, Morell M, Jiménez-Astorga C, Estivill X, Sala N. Severe type I protein C deficiency in a compound heterozygote for Y124C and Q132X mutations in exón 6 of the PROC gene. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1215-20.
75. Arias-Salgado EG, Tao J, González-Manchón C, Butta N, Vicente V, Ayuso MS, Parrilla R. Nonsense mutation in exon-19 of GPIIb associated with thromboastenic phenotype. Failure of GPIIb(597-1008) to associate with GPIIIa. *Thromb Haemost* 2002; 87: 684-91.

76. Jayo A, Conde I, Lastres P, Martínez C, Rivera J, Vicente V, González-Manchón C. L718P mutation in the membrane-proximal cytoplasmic tail of beta 3 promotes abnormal alpha IIb beta 3 clustering and lipid microdomain coalescence, and associates with a thrombasthenia-like phenotype. *Haematologica* 2010; 95: 1158-66.
77. Corral J, Aznar J, González-Conejero R, Villa P, Miñano A, Vayá A, et al. Homozygous deficiency of heparin cofactor II. Relevance of P17 glutamate residue in serpins, relationship with conformational diseases, and role in thrombosis. *Circulation* 2004; 110: 1303-7.
78. Corral J, Huntington JA, Martínez C, González-Conejero R, Mushunje A, Navarro M, 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.
79. Corral J, Hernández-Espinosa D, Soria JM, González-Conejero R, Ordóñez A, González-Porras JR, et al. Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2007; 109: 4258-63.
80. Savoia A, Pastore A, De Rocco D, Civaschi E, Di Stazio M, Bottega, R, et al. Clinical and genetics aspects of Bernard-Soulier síndrome: searching for genotype/phenotype correlations. *Haematologica* 2011; 96: 417-23.
81. Martínez-Martínez I, Ordóñez A, Navarro-Fernández J, Pérez-Lara A, Gutiérrez-Gallego R, Giraldo R, et al. Antithrombin Murcia (K241E) causing antithrombin deficiency: a possible role for altered glycosylation. *Haematologica* 2010; 95: 1358-65.
82. Morange PE, Tregouet DA. Lessons from genome-wide association studies in venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2011; 9 (Supl 1): 258-64.
83. Hernández-Espinosa D, Miñano A, Martínez C, Pérez-Ceballos E, Heras I, Fuster JL, et al. L-asparaginase-induced antithrombin type I deficiency: Implications for conformational diseases. *Am J Pathol* 2006; 169: 142-53.
84. Hernández-Espinosa D, Miñano A, Martínez C, Ordóñez C, Pérez-Ceballos E, de Arriba F, et al. Inhibition of proteasome by bortezomib causes intracellular aggregation of hepatic serpins and increases the latent circulating form of antithrombin. *Lab Invest* 2008; 88: 306-17.
85. Ordóñez A, Yélamos J, Pedersen S, Miñano A, Conesa-Zamora P, Kristensen SR, et al. Increased levels of citrullinated antithrombin in plasma of patients with rheumatoid arthritis and colorectal adenocarcinoma determined by a newly developed ELISA using a specific monoclonal antibody. *Thromb Haemost* 2010; 104: 1143-9.
86. Hernández-Espinosa D, Ordóñez A, Vicente V, Corral J. Factors with conformational effects on haemostatic serpins: implications in thrombosis. *Thromb Haemost* 2007; 98: 557-63.
87. Hernández-Espinosa D, Mota R, Miñano A, Ordóñez A, Yélamos J, Vicente V, Corral J. In vivo effects of hyperthermia on the functional and conformational characteristics of antithrombin. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 963-70.
88. Vicente V. El equilibrio hemostático, un proceso complejo y dinámico. *Haematologica* 2004; 89 (Suppl. 1): 87-98.
89. Navarro S, Medina P, Mira Y, Estellés A, Villa P, Ferrando F, et al. Haplotypes of the EPCR gene, prothrombin levels, and the risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A mutation. *Haematologica* 2008; 93: 885-91.
90. Medina P, Navarro S, Estellés A, España F. Polymorphism in the endothelial protein C receptor gene and thrombophilia. *Thromb Haemost* 2007; 98: 564-9.
91. Vicente V, González-Conejero R, Rivera J, Corral J. The prothrombin gene variant 20210A in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica* 1999; 84: 356-62.
92. Corral J, Roldán V, Vicente V. Deep venous thrombosis or pulmonary embolism and factor V Leiden: enigma or paradox. *Haematologica* 2010; 95: 863-6.
93. Miñano A, Ordóñez A, España F, González-Porras JR, Lecumberri R, Fontcuberta J, et al. ABO blood group and risk of venous or arterial thrombosis in carriers of factor V Leiden or prothrombin G20210A polymorphisms. *Haematologica* 2008; 93: 729-34.
94. Bernardi F, Arcieri P, Bertina R, 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 population. *Arter Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2548-53.
95. Corral J, Antón AI, Quiroga T, González-Conejero R, Pereira J, Roldán V, et al. Influence of the F12-4 C>T polymorphism on hemostatic test. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010; 21: 632-9.
96. González-Conejero R, Corral J, Lozano ML, Rivera J, Morales JM, Vicente V. Polymorphisms of platelet glycoprotein Iba associated with arterial thrombotic disease. *Blood* 1998; 92: 2771-6.
97. Lozano ML, González-Conejero R, Corral J, Rivera J, Iniesta JA, Martínez C, Vicente V. Polymorphisms of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) are associated with neutrophil-platelet adhesion and ischaemic cerebrovascular disease. *Br J Haematol* 2001; 115: 969-76.
98. Corral J, González Conejero R, Vicente V. Genetics determinants of platelet function in thromboembolic diseases. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18 (2): 166-71.
99. Corral J, González-Conejero R, Soria JM, González-Paras JR, Pérez-Ceballos E, Lecumberri R, et al. A nonsense polymorphism in the protein Z-dependent protease inhibitor increases the risk for venous thrombosis. *Blood* 2006; 108: 177-83.
100. González-Conejero R, Corral J, Roldán V, Martínez C, Marín F, Rivera J, et al. A common polymorphism in the annexin V Kozak sequence (-1C to T) increases translation efficiency and plasma levels of annexin V, and decreases the risk of myocardial infarction in young patients. *Blood* 2002; 100: 2081-6.
101. Roldán V, González-Conejero R, Marín F, Pineda J, Vicente V, Corral J. Short alleles of P-Selectin glycoprotein ligand against premature myocardial infarction. *Am Heart J* 2004; 48: 602-5.
102. Corral J, Iniesta JA, González-Conejero R, Villalón M, Vicente V. Polymorphisms of clotting factors modify the risk of primary intracranial hemorrhage. *Blood* 2001; 97: 2979-82.
103. González-Conejero R, Corral J, Guerrero JA, Iniesta JA, Rivera J, de Arriba F, Vicente V. Genetic variants of the extra-large stimulatory Gs protein alpha-subunit and risk of thrombotic and haemorrhagic disorders. *Br J Haematol* 2004; 125: 621-8.
104. Iniesta JA, Corral J, González-Conejero R, Piqueras C, Vicente V. Polymorphisms of platelet adhesive receptors: Do they play a role in primary intracerebral hemorrhage? *Cerebrovasc Dis* 2003; 15: 51-5.
105. Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* 2008; 112: 19-27.
106. Almasly L, Soria JM, Souto JC, Coll I, Bacq D, Faure A, et al.; Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia project. A quantitative trait locus influencing free plasma protein S levels on human chromosome 1q: results from the Genetic analysis of idiopathic Thrombophilia (GAIT) project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 508-11.
107. Soria JM, Almasly L, Souto JC, Buil A, Martínez-Sánchez E, Mateo J, et al. A new locus on chromosome 18 that influences normal variation in activated protein C resistance phenotype and factor VIII activity and its relation to thrombosis susceptibility. *Blood* 2003; 101: 163-7.

108. Souto JC, Blanco-Vaca F, Soria JM, Buil A, Almasy L, et al. A genomewide exploration suggest a new candidate gene at chromosome 11q23 as the major determinat of plasma homocysteine levels: results from the GAIT project. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 925-33.
109. Roldán V, González-Conejero R, Marín F, Pineda J, Vicente V, Corral J. Five prothrombotic polymorphism and the prevalence of premature myocardial infarction. *Haematologica* 2005; 90: 421-3.
110. Corral J, Zuazu I, Rivera J, González-Conejero R, Ferrer F, Vicente V. Clinical and analytical relevance of the combination of prothrombin 20210 A/A and factor V Leiden: results from a large family. *Br J Haematol* 1999; 105: 560-3.
111. Iniesta JA, González-Conejero R, Piqueras C, Vicente V, Corral J. Platelet GP IIa polymorphism HPA-1 (PIA) protects against subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2004; 35: 2282-6.
112. Roldán V, Corral J, Marín F, Pineda J, Vicente V, González R. Synergistic association between hipercolesterolemia and a common C46T polymorphism in the Kozak region of Factor XII for developing premature myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2005; 94: 1187-92.
113. Wang L, McLeod HL, Weinshilbourm RM. Genomics and drug response. *N Engl J Med* 2011; 364: 1144-53.
114. Pérez-Andreu V, Roldán V, González-Conejero R, Hernández-Romero D, Vicente V, Marín F. Implications of pharmacogenetics for oral anticoagulants metabolism. *Current Drug Metabolism* 2009; 10: 632-42.
115. Marín F, González-Conejero R, Caprazano P, Bass TA, Roldán V, Angiolillo DJ. Pharmacogenetics in cardiovascular antithrombotic therapy. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 1041-57.
116. González-Conejero R, Corral J, Roldán V, Ferrer F, Sánchez-Serrano I, Sánchez-Blanco JJ, et al. The genetic interaction between VKORC1 c1173t and calumenin a29809g modulates the anticoagulant response of acenocoumarol. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1701-6.
117. Pérez-Andreu V, Roldán V, Anton AI, García-Barbera N, Corral J, Vicente V, González-Conejero R. Pharmacogenetic relevance of CYP4F2 V433M polymorphism on acenocoumarol therapy. *Blood* 2009; 113: 4977-9.
118. Pérez-Andreu V, Roldán V, López-Fernández MF, Antón AI, Alberca I, Corral J, et al. Pharmacogenetics of acenocoumarol in patients with extreme dose requirements. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1012-7.
119. Marín F, González-Conejero R, Lee KW, Corral J, Roldán V, López F, et al. A pharmacogenetic effect of Factor XIII valine 34 leucine polymorphism on fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 25-9.
120. González-Conejero R, Fernández-Cadenas I, Iniesta JA, Marti-Fabregas J, Obach V, Alvarez-Sabin J, et al. Gene-environment interactions in thrombolytic therapy in stroke patients: role of fibrinogen levels and factor XIII V34L polymorphism. *Stroke* 2006; 37: 2288-93.
121. Hernández-Romero D, Marín F, Lee KW, Roldán V, Caturla J, Corral J, et al. Synergism between factor XII -4C>T and factor XIII Val34Leu polymorphisms in fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2010; 104: 650-2.
122. Feero WG, Gutmacher AE, Collins FS. Genomic medicine. An updated primer. *N Engl J Med* 2010; 362: 2001-11.
123. García A. Clinical proteomics in platelet research: challenges ahead. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1784-5.
124. Howes JM, Keen JN, Findlay JBC, Carter AM. The application of proteomics technology to thrombosis research: the identification of potential therapeutic targets in cardiovascular disease. *Diabetes Vasc Dis Res* 2008; 5: 205-12.
125. Anderson NL. The clinical plasma proteome: a survey of clinical assay for proteins in plasma and serum. *Clin Chem* 2010; 56: 177-85.
126. Manolio TA. Genome association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010; 362: 166-76.
127. Gretarsdottir S, Baas AF, Thorleifsson G, Holm H, den Heijer M, de Vries JP, et al. Genome-wide association study identifies a sequence variant within the DAB2IP gene conferring susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Nature Genetic* 2010; 42: 692-7.
128. Guerrero JA, Rivera J, Quiroga T, Martínez-Pérez A, Antón AI, Martínez C, et al. Novel loci involved on platelet function and platelet count identified by a genome-wide study performed in children. *Haematologica* 2011; May 5. [Epub ahead of print].
129. Kingsley CB. Identification of causal sequence variants of disease in the next generation sequencing era. *Methods Mol Biol* 2011; 700: 37-46.
130. Teruel R, Corral J, Pérez-Andreu V, Martínez-Martínez I, Vicente V, Martínez C. Potential role of miRNAs in developmental haemostasis. *PLoS ONE* 2011; 6: e17648.
131. Palsson B. The challenges of in silico biology. *Nature Biotech* 2000; 18: 1147-50.