

# Genómica en hemostasia

COORDINADORES: J. CORRAL. *Murcia*  
J.M. SORIA. *Barcelona*

## Presentación

El componente genético es imprescindible en el estudio de cualquier mecanismo fisiológico y sus patologías asociadas; y las alteraciones del sistema hemostático no son ninguna excepción. Por supuesto, en enfermedades monogénicas (con un elevando componente genético localizado en uno o pocos genes), pero también en enfermedades complejas (donde el componente genético está más diluido y disperso en multitud de genes), la identificación tanto del gen como de las alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo o pronóstico de las mismas ha sido, sigue y seguirá siendo un objetivo prioritario de la investigación biomédica. Esta investigación ha marcado el cambio y/o desarrollo de nuevos conceptos en hemostasia. Desde el inicio, en el que la mayoría de las enfermedades asociadas con el defectuoso funcionamiento del sistema hemostático eran consideradas como enfermedades monogénicas, a la identificación de componentes genéticos implicados en la respuesta al tratamiento, pasando por la identificación de alteraciones polimórficas protrombóticas y el concepto de enfermedad poligénica compleja. En este simposio se repasan estos conceptos en las excelentes ponencias del doctor España y la doctora González-Conejero. En la primera ponencia se revisa de forma sucinta pero magistral las enfermedades monogénicas hemostáticas. Se exponen ejemplos representativos de los diferentes mecanismos moleculares (autosómico dominante, autosómico recesivo, ligado al cromosoma X) que, afectando un solo gen, condicionan el desarrollo de enfermedades hemostáticas. Estas enfermedades, que afectan tanto a componentes plaquetarios como de la cascada de la coagulación (procoagulantes y anticoagulantes) desequilibran de forma dramática al sistema hemostático, provocando enfermedades tanto trombóticas como hemorrágicas que han sido referencia para todo hematólogo: hemofilia, Glanzmann, deficiencia de antitrombina, etc. Por otro lado, el doctor España también introduce el concepto de enfermedad poligénica incluso para las consideradas clásicamente como monogénicas y, sin duda, para las enfermedades complejas, como en la ponencia del doctor Morange se pone claramente de manifiesto.

La doctora González-Conejero hace una exhaustiva revisión de los elementos genéticos implicados en los 3 grandes tratamientos que tienen como diana elementos del sistema hemostático: las terapias antiagregante, anticoagulante y fibrinolítica. Es quizás, hoy por hoy, el apartado donde los estudios genéticos puedan tener más relevancia clínica y pueden beneficiar a un mayor número de pacientes, como refleja el hecho de que para dos situaciones (anticoagulación con warfarina y antiagregación con clopidogrel), ya existen indicaciones específicas por parte de la Food and Drug Administration (FDA). Ello, sin duda, es debido a que se trata de sistemas en los que el número de elementos implicados es menor (la diana del fármaco y las moléculas implicadas en su absorción, metabolización y eliminación). Así, el peso de polimorfismos comunes, frecuentes en la población y que en condiciones normales, sin fármaco, no tienen graves consecuencias fisiológicas, es muy elevado. A pesar de las fuertes asociaciones positivas encontradas en algunas terapias, es necesario continuar el estudio e identificar nuevos elementos genéticos con relevancia farmacogenética en terapias dirigidas contra elementos del sistema hemostático, quizás también con los nuevos anticoagulantes.

El desarrollo de la genética ha ido de la mano del desarrollo tecnológico. Los estudios genéticos clásicos se reducían a pocas anomalías de un solo gen, eran costosos y sólo se podían desarrollar en laboratorios de excelencia mundial. Los avances tecnológicos han permitido cierta globalización del estudio molecular en hemostasia y en trombosis. De forma paralela, van apareciendo nuevas metodologías que permiten un análisis genético masivo, que facilita una nueva aproximación a la base molecular de la enfermedad, de la que seguro todavía no hemos alcanzado su mayor desarrollo. En la ponencia del doctor Morange se muestra una de estas aproximaciones, el análisis de asociación global del genoma (*genome wide associa-*

*tion analysis*, conocido por sus siglas: GWAS). Esta estrategia analiza miles, incluso millones, de polimorfismos que cubren el genoma completo, para identificar nuevos genes y variaciones genéticas implicadas en diferentes enfermedades (2.000 nuevos genes, como recoge la ponencia del doctor Morange), también en la fisiopatología del sistema hemostático. Con esta estrategia, se abandonan los primigenios estudios dirigidos y nos permitirá identificar moléculas que ni siquiera habríamos sospechado pudieran jugar un papel en hemostasia. Es una aproximación también con limitaciones, principalmente la escasa relevancia clínica de los polimorfismos identificados, o la debilidad para detectar polimorfismos de baja prevalencia, como la protrombina G20210A. Todos estos aspectos los desarrolla de forma excelente el doctor Morange en su ponencia. Nuevas perspectivas se abren en este campo, como los estudios de correlación genotipo-fenotipo basados en estrategias GWAS, como indica el doctor Morange, que grupos españoles ya hemos empleado y, sobre todo, la implementación de las nuevas técnicas de secuenciación de alta resolución que aportarán nuevos datos al componente genético de las enfermedades relacionadas con el sistema hemostático.

Finalmente, no todos los estudios de búsqueda de nuevos elementos genéticos implicados en el desarrollo de trombosis deben basarse en estudios experimentales. La doctora Vossen nos muestra en su ponencia de forma sencilla y comprensible las posibilidades del estudio bioinformático del componente genético en trombosis venosa. De hecho, las posibilidades de este campo, junto a los recursos de cálculo computacional y el extraordinario coste económico de aproximaciones experimentales no dirigidas (GWAS o secuenciación masiva) apoyan la realización, al menos en las fases iniciales, de estudios teóricos. Esta aproximación también tiene limitaciones. Quizás la de mayor peso es que no tenemos garantía absoluta de la fiabilidad de las simulaciones. Y, sin duda alguna, la necesidad de una posterior validación experimental. Pero ya existen resultados positivos de esta aproximación, como recoge la doctora Vossen, especialmente en el campo de identificación de mi-ARN implicados en hemostasia y trombosis, que animan a realizar nuevos estudios siguiendo esta estrategia.

Los coordinadores del simposio estamos encantados de constatar que el estudio de la genética en hemostasia, más allá de los avances actuales, tiene un largo y productivo futuro, tal y como han plasmado de forma magistral los ponentes seleccionados, expertos internacionales en sus campos, que han hecho un importante esfuerzo en mostrar tanto el estado actual de cada uno de sus campos como en definir e indicar las perspectivas y retos que nos encontraremos en los próximos años.

## CONTRIBUTION OF A FRENCH GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY ON VENOUS THROMBOSIS ON THE IDENTIFICATION OF NEW GENETIC RISK FACTORS

P.E. MORANGE<sup>1</sup>, D.A. TREGOUET<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INSERM, UMR\_S 626, F-13385. Université de la Méditerranée. Marseille (Francia)

<sup>2</sup> INSERM UMR\_S 937. Université Pierre et Marie Curie (Paris 6). París (Francia)

In the last five years, the GWAS approach (for genome-wide association studies) was considered by some to be the panacea in order to identify novel susceptibility loci to complex human diseases. This could be debatable but the impressive success with about 2,000 new loci (end of 2010) found associated with human diseases and their quantitative risk factors (<http://www.genome.gov/gwastudies/>) strongly support this strategy. While genetic research enters now the era of the whole exome or genome approach for dissecting the genetic architecture of human traits, we feel it is the right time to make a brief review of the main findings derived from the only GWAS performed so far on venous thrombosis (VT).

This GWAS was performed by our group and our national partners, and investigated about 300,000 single nucleotide polymorphisms (SNPs) spread over the whole genome<sup>(1)</sup>. In this work, only associations at two known loci, FV and ABO, reached the statistical threshold required for declaring genome-wide significance ( $\sim p < 10^{-7}$ ). This was likely due to the lack of power of our study that was based on a sample of 418 VT patients and 1,228 healthy controls, all of French origin. Nevertheless, using different additional strategies for digging into the heap of p-values generated by this GWAS, we were able to identify novel VT-associated SNPs (Table 1).

Firstly, by adopting a multi-stage strategy that investigated in different replication cohorts all SNPs that did not reach genome-wide significance but that were nevertheless quite highly significant ( $p < 10^{-5}$ ), our group together with the group of Prof. Rosendaal (Leiden, Netherlands) identified a new susceptibility locus on chromosome 6p24.1 coding for a NF- $\kappa$ B like transcription factor involved in the interleukin pathway, the HIVEP1 gene<sup>(2)</sup>.

More precisely, using the concerted efforts of 4 cohorts gathering about 6,000 VT cases and 7,000 controls, the rs169713-C allele was found more frequent in patients than in controls (0.24 vs. 0.21) and associated with an increased odds ratio (OR) for VT of 1.20 with corresponding p-value  $2.86 \times 10^{-9}$ . Functional

studies are ongoing to characterize the role of this genomic region in the susceptibility to VT.

Secondly, we have used our GWAS results as well as two additional French case-controls studies on VT, *MARTHA* and *FARIVE* gathering 1,757 VT patients and 1,408 controls, to test the effect on VT of SNPs that were found through genome-wide studies associated with key quantitative risk factors of VT. The underlying hypothesis is that polymorphisms associated with increased (decreased) levels of the quantitative risk factor should be associated with increased (decreased) risk of the disease.

Applying a familial GWAS approach on 3 different isoforms of the C4b-binding protein; a protein participating to the protein S pathway, together with the group of Dr. José-Manuel Soria (Barcelona, Spain) we observed that the rs3813948 at the C4BPB/C4BPA locus could influence plasma levels of the  $\alpha_2\beta_0$  isoform and also C4BPA monocyte expression<sup>(3)</sup>. The rs3813948-C allele associated with increased levels was found in our GWAS on VT more frequent in cases than in controls (0.093 vs. 0.067;  $p = 0.012$ ). This association with VT was then replicated in *MARTHA* and *FARIVE*, where the frequency of the rs3913948-C allele was 0.091 and 0.079 in cases and controls, respectively, and carrying the C allele associated with an increased OR of 1.24 [1.00-1.53] ( $p = 0.046$ )<sup>(3)</sup>.

Following the results of linkage analyses performed in extended French-Canadian pedigrees that identified two novel regions, 6q13-14 and 12q23, linked to plasma levels of FVIII and vWF, we investigated in our GWAS results whether these two linkage regions could harbor SNPs associated with VT<sup>(4)</sup>. In the 6q13-14 region, several SNPs downstream from the BAI3 locus showed suggestive evidence of association ( $p < 10^{-4}$ ) with the disease. Pursuing these findings in *MARTHA* and *FARIVE* led us to observe that the rs9363864-AA genotype was associated with a lower risk of VT (OR = 0.58 [0.42-0.80];  $p = 0.005$ ) in non carriers of FV Leiden and/or Prothrombin G20210A mutations. This effect was consistent with what was observed in the GWAS. No association was observed (OR = 1.11 [0.68-1.80];  $p = 0.67$ ) in carriers of at least one of these mutations<sup>(4)</sup>. Conversely, the only SNP that showed association with  $p < 10^{-4}$  in the 12q23 linkage peak, the rs1593812 at the proximal promoter of STAB2, did not replicate in *MARTHA* nor in *FARIVE* (unpublished data). Nevertheless, the STAB2 locus was additionally identified as one of the novel loci influencing plasma levels of vWF and FVIII in a meta-analysis of GWAS studies conducted by the CHARGE consortium in about 23,000 participants<sup>(5)</sup>. This would suggest that STAB2 could be a true candidate for VT whose genetic variability deserves to be further investigated in relation to VT risk.

Table 1. New variants associated with VT identified by GWAS conducted in individuals of French origin

Locus	SNP	Alleles <sup>a</sup>	Frequency <sup>b</sup>	OR <sup>c</sup>	Associated phenotype <sup>d</sup>	References <sup>e</sup>
C4BPB/C4BPA	rs3813948	T/ <u>C</u>	0.09	1.24	↑ $\alpha_2\beta_2$ C4BP	(3)
CYP4V2	Rs13146272	A/ <u>C</u>	0.33	1.21	↑ FXI	(1)
GP6	rs1613662	A/ <u>G</u>	0.82	1.15	↑ platelet activation and aggregation	(1)
KNG1	rs710446	T/ <u>C</u>	0.45	1.20	↓ aPTT	(8)
HIVEP1	rs169713	T/ <u>C</u>	0.21	1.20	Still unknown	(2)
SERPINC1	rs2227589	C/ <u>I</u>	0.10	1.29	↓ antithrombin	(1)
TC2N	rs1884841	C/ <u>I</u>	0.50	1.22	↑ VWF	(6)
BAI3	rs9363864	G/ <u>A</u> <sup>f</sup>	0.54	1.72	↑ VWF	(4)

GWAS: genome-wide association studies; VT: venous thrombosis

<sup>a</sup> Underlined are the at risk alleles

<sup>b</sup> Estimates of the risk allele frequency observed in REFERENCES population

<sup>c</sup> Estimates of the odds ratio (OR) associated the risk allele

<sup>d</sup> Phenotype associated with the at risk allele

<sup>e</sup> According to REFERENCES numbering

<sup>f</sup> Assuming a recessive model

Among the other new loci identified by the CHARGE consortium as influencing plasma FVIII and/or vWF levels<sup>(5)</sup>, we observed that the TC2N locus could also be a strong candidate for VT<sup>(6)</sup>. Indeed, the TC2N rs1884841-T allele was found more frequent in VT cases than in controls, in our GWAS (0.50 vs. 0.43), in *MARTHA* (0.49 vs. 0.44) and in *FARIVE* (0.47 vs. 0.45)<sup>(6)</sup>. In the combined samples, the rs1884841-T allele was associated with an increased OR for VT of 1.22 [1.17-1.33] ( $p = 6.5 \times 10^{-6}$ ), this allele being a nearly perfect proxy for the rs10133762-T allele found associated with increased vWF levels in the CHARGE consortium<sup>(5)</sup>.

Three SNPs, rs27431672 (F12), rs9898 (HRG) and rs710446 (KNG1), were reported to influence aPTT levels in a GWAS carried out on a sample of 1,477 healthy individuals<sup>(7)</sup>. While the rs27431672 was not typed in our GWAS for VT and the rs9898-T had similar allele frequencies in cases and controls (0.32, each), the rs710446-C allele was slightly more frequent in cases than in controls (0.44 vs. 0.42; OR = 1.09) but the association was not significant ( $p = 0.31$ ) (unpublished data). Nevertheless, in an additional sample of 1,541 VT patients part of the still on-going *MARTHA* project and 1,110 healthy controls from the *Thee-City* study<sup>(8)</sup>, the rs710446-C allele was also found more frequent in cases than in controls (0.45 vs. 0.41). The corresponding allelic OR for VT was 1.20 [1.07-1.34] ( $p = 0.0012$ )<sup>(8)</sup>. This association was further replicated in the *FARIVE* study with allele frequencies 0.46 and 0.42 in cases and controls, respectively, and allelic OR of 1.17 [0.89-1.54] ( $p = 0.059$ ). Combining together the results of the three association studies, the total evidence in favour of the association of rs710446 with VT became OR = 1.16 [1.06-1.26]

( $p = 7.39 \times 10^{-4}$ ). The increased risk of VT observed for the rs710446-C is compatible with the decreased aPTT levels observed in<sup>(7)</sup> and what is expected from the known traditional biology relating aPTT to VT. Rs710446 refers to the non-synonymous Ile581Thr variant of the KNG1 gene encoding high molecular weight kininogen (HK), another obvious candidate for VT pathophysiology.

The above examples of SNPs initially detected from GWAS on quantitative traits and subsequently found associated with modest risk of VT (OR < 1.20), and therefore with p-value that could not reach genome-wide significance in absence of very large samples, clearly illustrate the lack of power of our GWAS to detect modest genetic effects even at a low stringent statistical threshold of  $10^{-3}$  or  $10^{-2}$ . This point could be further illustrated by noting that the CYP4V2 rs13146272-A and GP6 rs1613662-A alleles that had been found significantly associated with VT (OR = 1.21 [1.12-1.31];  $p = 7.41 \times 10^{-7}$ ; and 1.18 [1.07-1.29];  $p = 4.85 \times 10^{-4}$ , respectively), in the *MEGA* study gathering 2,712 deep vein thrombosis (DVT) cases and 4,634 controls<sup>(9)</sup>, were only marginally associated with VT in our GWAS,  $p = 0.020$  and  $p = 0.039$ , respectively<sup>(1)</sup>. These two SNPs were further genotyped in *MARTHA* and *FARIVE*, and their association with VT were homogeneously reproduced<sup>(1)</sup>. When the 3 French cohorts were combined, the allelic ORs for VT associated with the rs1613662-T allele was 1.25 [1.09-1.43] ( $p = 0.002$ ) and that for rs13146272-A was 1.19 [1.05-1.35] ( $p = 0.007$ ). However, in this combined analysis, no association (OR = 1.05 [0.92-1.21];  $p = 0.454$ ) was observed with the rs2227589-A allele unlike the previous reported OR of 1.26

[1.13-1.42] ( $p = 5.93 \times 10^{-5}$ )<sup>(9)</sup>. GP6 encodes the receptor glycoprotein (GP)VI that has a major role in collagen-induced platelet signalling. The rs1613662-G was found associated with reduced platelet functions<sup>(10)</sup>. CYP4V2 maps close to the F11 gene coding for FXI, an obvious candidate for VT susceptibility and further works showed that the association of rs13146272 with VT was due to its linkage disequilibrium with two F11 SNPs, rs2289252 and rs2036914, the latter two acting additively to influence DVT risk through a modulation of FXI levels<sup>(11)</sup>.

Very recently, two SNPs that had been found influencing vWF and FVIII plasma levels in the CHARGE consortium<sup>(5)</sup> were further found associated with the risk of VT in the *MEGA* and *HVH* studies totalling 5,569 controls and 5,123 VT cases<sup>(12)</sup>. The rare allele of STXBP5 rs1039084 was associated with a decreased risk of 0.90 [0.82-0.98] ( $p < 10^{-4}$ ) and that of the VWF rs1063856 with an increased OR of 1.16 [1.06-1.26] ( $p < 10^{-5}$ ). The same trend of association was observed in our GWAS (unpublished data) but, probably due to low sample size, these associations were far from reaching significance (OR = 0.95 [0.81-1.11];  $p = 0.51$ ; and OR = 1.05 [0.89-1.24];  $p = 0.56$ , respectively). The rs1063856 codes for a non-synonymous Thr789Ala substitution in exon 18 of the VWF gene at a site encoding for the D' domain, which is involved in binding of FVIII. It could be hypothesized that the nucleotide change at amino acid 789 increases the efficiency with which the VWF molecule transports or releases FVIII into circulation, thereby increasing the risk of VT. STXBP5 have not been shown to be involved in vWF secretion; however, these observations may indicate a functional role of these proteins in determining circulating vWF levels.

In addition to aPTT, FVIII, VWF and protein S related phenotypes aforementioned, there have been additional quantitative risk factors that have recently been investigated through the GWAS strategy, such as D-dimer<sup>(13)</sup>, protein C<sup>(14)</sup> and PAI-1 levels<sup>(15)</sup>. The impact on VT risk of the identified SNPs deserves further attention.

## Conclusion

In conclusion, even though it was not well powered, the only GWAS conducted so far on VT substantially contributed to the identification of novel susceptibility loci for the disease.

All elements collected so far strongly confirm the complexity of the disease where multiple common SNPs with modest effect interfere. Among the future directions to follow, the identification of new VT variants will require big consortia assembling large

sample sizes as well as the study of new pertinent quantitative traits related to VT.

## References

- 1 Tregouet DA, Heath S, Saut N, Biron-Andreani C, Schved JE, Pernod G, et al. Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. *Blood* 2009; 113: 5298-303.
- 2 Morange PE, Bezemer I, Saut N, Bare L, Burgos G, Brocheton J, et al. A follow-up study of a genome-wide association scan identifies a susceptibility locus for venous thrombosis on chromosome 6p24.1. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 592-5.
- 3 Buil A, Tregouet DA, Souto JC, Saut N, Germain M, Rotival M, et al. C4BPB/C4BPA is a new susceptibility locus for venous thrombosis with unknown protein S-independent mechanism: results from genome-wide association and gene expression analyses followed by case-control studies. *Blood* 2010; 115: 4644-50.
- 4 Antoni G, Morange PE, Luo Y, Saut N, Burgos G, Heath S, et al. A multi-stage multi-design strategy provides strong evidence that the BA13 locus is associated with early-onset venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2671-9.
- 5 Smith NL, Chen MH, Dehghan A, Strachan DP, Basu S, Soranzo N, et al. Novel associations of multiple genetic loci with plasma levels of factor VII, factor VIII, and von Willebrand factor: The CHARGE (Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology) Consortium. *Circulation* 2010; 121: 1382-92.
- 6 Morange PE, Saut N, Antoni G, Emmerich J, Tregouet DA. Impact on venous thrombosis risk of newly discovered gene variants associated with FVIII and VWF plasma levels. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 229-31.
- 7 Houlihan LM, Davies G, Tenesa A, Harris SE, Luciano M, Gow AJ, et al. Common variants of large effect in F12, KNG1, and HRG are associated with activated partial thromboplastin time. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 626-31.
- 8 Morange PE, Oudot-Mellakh T, Cohen W, Germain M, Saut N, Antoni G, et al. KNG1 Ile581Thr and susceptibility to venous thrombosis. *Blood* 2011; 117 (13): 3692-4.
- 9 Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, et al. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *Jama* 2008; 299: 1306-14.
- 10 Snoep JD, Gaussem P, Eikenboom JC, Emmerich J, Zwagenga JJ, Holmes CE, et al. The minor allele of GP6 T13254C is associated with decreased platelet activation and a reduced risk of recurrent cardiovascular events and mortality: results from the SMILE-Platelets project. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2377-84.
- 11 Li Y, Bezemer ID, Rowland CM, Tong CH, Arellano AR, Catanese JJ, et al. Genetic variants associated with deep vein thrombosis: the F11 locus. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1802-8.
- 12 Smith NL, Rice KM, Bovill EG, Cushman M, Bis JC, McKnight B, et al. Genetic variation associated with plasma von Willebrand factor levels and the risk of incident venous thrombosis. *Blood* 2011; 117 (22): 6007-11.
- 13 Smith NL, Huffman JE, Strachan DP, Huang J, Dehghan A, Trompet S, et al. Genetic predictors of fibrin d-dimer levels in healthy adults. *Circulation* 2011; 123: 1864-72.
- 14 Tang W, Basu S, Kong X, Pankow JS, Aleksic N, Tan A, et al. Genome-wide association study identifies novel loci for plasma levels of protein C: the ARIC study. *Blood* 2010; 116: 5032-6.
- 15 Lanktree MB, Johansen CT, Anand SS, Davis AD, Miller R, Yusuf S, Hegele RA. Genetic variation in hyaluronan metabolism loci is associated with plasma plasminogen activator inhibitor-1 concentration. *Blood* 2010; 116: 2160-3.

## FARMACOGENÉTICA EN HEMOSTASIA

R. GONZÁLEZ-CONEJERO<sup>1</sup>, F. MARÍN<sup>2</sup>,  
V. ROLDÁN<sup>1</sup>, V. VICENTE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Regional de Hemodonación. Hospital Universitario Morales Meseguer. Universidad de Murcia. <sup>2</sup> Servicio de Cardiología. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia

La trombosis es el mecanismo subyacente más importante de la enfermedad tromboembólica, por lo que la terapia antitrombótica se utiliza habitualmente en las enfermedades cardiovasculares. La eficacia clínica del fármaco antitrombótico no es homogénea y una proporción importante de los pacientes seguirán sufriendo un evento trombotico nuevo. Varios factores (trastornos metabólicos, edad, función renal y hepática, diabetes, tabaquismo, etc.) participan en esta heterogeneidad interindividual, aunque no explican completamente la elevada variabilidad de respuesta. Aquí revisaremos la influencia de los polimorfismos genéticos en la eficacia de los fármacos antitrombóticos.

### Farmacogenética: una breve descripción

La farmacogenética es el estudio de cómo las diferencias genéticas influyen en la variabilidad de respuesta de los pacientes a los fármacos y el riesgo individual de desarrollar una reacción adversa. Hay varias formas en las que los polimorfismos pueden tener efecto farmacogenético: influir en el metabolismo de fármacos (mediante la modificación de la función de las enzimas que metabolizan el fármaco) de forma que la misma dosis administrada puede llegar a niveles terapéuticos en algunos individuos, pero no en otros. También pueden modificar la farmacocinética de una droga, afectando su capacidad de unión a proteínas diana. Absorción, distribución, excreción y detoxificación también pueden modular la respuesta definitiva individual a la droga. El objetivo final de la farmacogenética es la selección de una terapia personalizada para reducir la incidencia de reacciones adversas a los medicamentos y mejorar la eficacia del tratamiento.

### Agentes antiplaquetarios

El papel fundamental de las plaquetas en la patogénesis de la aterotrombosis subraya la importancia de la terapia antiplaquetaria temprana y sostenida. Desafortunadamente, los agentes antiplaquetarios actualmente aprobados tienen limitaciones y un número

considerable de pacientes tratados sufrirá un evento trombotico nuevo a pesar de estar en los regímenes de tratamiento recomendados, dando lugar al concepto de resistencia a los fármacos antiplaquetarios. Este concepto es controvertido y, por lo tanto, su prevalencia varía ampliamente, dependiendo de los métodos de laboratorio utilizados y/o la población estudiada. Factores demográficos y clínicos participan en esta heterogeneidad de la respuesta individual. Los factores genéticos también han sido implicados en la respuesta del paciente a los fármacos antiplaquetarios.

Las proteínas expresadas en la superficie de la plaqueta juegan un papel clave en la adhesión, activación y agregación. La glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) es uno de los complejos más importantes de plaquetas, como lo demuestra el sangrado grave asociado con la deficiencia de estas proteínas<sup>(1)</sup>. La GP IIb/IIIa juega un papel fundamental en la activación y agregación plaquetaria por la unión del fibrinógeno y el factor de Von Willebrand. Muchos antiagregantes plaquetarios tienen, directa o indirectamente, a este complejo como su principal objetivo. El polimorfismo más estudiado que afecta a este complejo es el cambio Pro33Leu. Se ha sugerido que este polimorfismo modula la función plaquetaria y, en particular, el alelo Leu se ha asociado con aumento de la reactividad plaquetaria<sup>(2)</sup>. Un segundo complejo en la superficie de la plaqueta que juega un papel clave en la adhesión plaquetaria es el receptor de alta afinidad para el colágeno, el GP Ia/IIa. El polimorfismo más relevante es C807T, que se asocia con variaciones en la expresión del receptor en la superficie plaquetaria<sup>(3)</sup>. Así, el alelo 807T, está asociado con una expresión hasta 10 veces mayor de este receptor, puede afectar la función plaquetaria y podría modificar el efecto de los fármacos antiplaquetarios. Por último, otras terapias antiagregantes tienen como objetivo otros receptores plaquetarios o compuestos importantes para la activación de las vías secundarias. La Tabla 1 resume los estudios de farmacogenética de los principales agentes antiplaquetarios.

### Aspirina

Es el agente antitrombótico más utilizado en la práctica clínica, ya que ha demostrado reducir el riesgo de eventos tromboticos significativamente<sup>(4)</sup>. Los efectos antiplaquetarios de la aspirina (ácido acetilsalicílico) se relacionan con su capacidad de acetilar irreversiblemente la ciclooxigenasa-1 (COX-1), lo que lleva a la supresión de la generación de tromboxano A<sub>2</sub> y metabolitos relacionados. La relevancia de los polimorfismos que afectan a la diana de la aspirina, la enzima COX-1, en farmacogenética es intuitiva. El cambio C50T del gen COX-1 puede modificar la actividad de la enzima y, por tanto, influir en los requerimientos de dosis de aspirina. Nuestro grupo ha descrito que C50T se asocia con los nive-

Tabla 1. Polimorfismos genéticos relacionados con la farmacogenética de los antiagregantes plaquetarios

	Polimorfismo	Efecto funcional	Efecto clínico
<b>Aspirina</b>			
Glicoproteína IIIa	PI <sup>A</sup> (Pro33Leu)	El alelo PI <sup>A2</sup> requiere mayores dosis de aspirina para un mismo efecto antiagregante que el alelo PI <sup>A1</sup>	Mayor riesgo de trombosis, peor evolución tras angioplastia o implantación de un stent
Glicoproteína Ia	C807T	Asociado con los niveles de expresión en la superficie y mayor reactividad plaquetaria	Sin asociación clínica
COX-1	C50T	Asociado con mayores niveles de TxB <sub>2</sub>	No hay datos clínicos
COX-2	G-765C	Asociado con mayor reducción de los niveles de TxB <sub>2</sub> tras aspirina	No hay datos clínicos
ADP receptor	P2Y <sub>11</sub>	Asociado con menor reducción en la agregación plaquetaria tras aspirina	No hay datos clínicos
<b>Clopidogrel</b>			
Glicoproteína IIIa	PI <sup>A</sup> (Pro33Leu)	Menor reducción de agregación plaquetaria con clopidogrel en la fase aguda del tratamiento	No hay datos clínicos
Glicoproteína Ia	C807T	Mayor reactividad plaquetaria del alelo T, probablemente por una mayor reactividad al colágeno fibrilar	Mayor riesgo trombótico
Protease-activated receptor-1 (PAR-1)	-14 A>T	Mayor reactividad plaquetaria	No hay datos clínicos
ADP receptor	P2Y <sub>11</sub>	Datos funcionales no concluyentes	Datos conflictivos
Citocromo P450	CYP3A4 (IVS10 + 12G>A)	Datos conflictivos en la variabilidad de respuesta	No hay datos clínicos
Citocromo P450	CYP2C19 (681G>A)	Menor reducción de agregación plaquetaria y menores niveles plasmáticos del metabolito activo	Peor evolución tras implantación de un stent
Multidrug resistance-associated protein-1 (MDR-1)	C3435T y C1236T	Disminución en la absorción del fármaco y menor formación de metabolito activo	No hay datos clínicos
<b>Ticlopidina</b>			
Glicoproteína IIIa	PI <sup>A</sup> (Pro33Leu)	Datos conflictivos	Datos conflictivos
<b>Inhibidores de glicoproteína IIb/IIIa</b>			
(Parenteral) GP IIIa	PI <sup>A</sup> (Pro33Leu)	Datos conflictivos	Datos conflictivos
(Oral) GP IIIa	PI <sup>A</sup> (Pro33Leu)	Interacciones adversas	Ausencia de beneficio clínico

les de tromboxano B<sub>2</sub>, antes y después del tratamiento con aspirina, en sujetos sanos<sup>(5)</sup>. Es importante destacar que los niveles de este metabolito son un buen marcador de riesgo trombótico en pacientes tratados con aspirina. Hemos encontrado una asociación significativa entre el polimorfismo de la COX-2 G-765C y la eficacia de la reducción de tromboxano B<sub>2</sub> después del tratamiento con aspirina<sup>(5)</sup>. Otros polimorfismos estudiados incluyen C893T en el receptor de ADP P2Y<sub>1</sub>, pero sin un mecanismo claro involucrado<sup>(6)</sup>. Estudios adicionales se deben realizar para confirmar estas asociaciones y evaluar el papel de estos polimorfismos en la enfermedad tromboembólica en pacientes tratados con aspirina.

Adicionalmente, es importante señalar que factores extrínsecos a la plaqueta pueden afectar la función plaquetaria. Por ejemplo, la aspirina parece afectarse por el polimorfismo hemostático Val34Leu, cambio que afecta a la activación de FXIII, su actividad transglutaminasa y la estructura del coágulo. Se ha descrito que

la inhibición de la activación FXIII por la aspirina es mayor en los portadores Leu34, lo que sugiere que estos pacientes podrían necesitar menor dosis de aspirina a igualdad de riesgo<sup>(7)</sup>.

### Derivados de tienopiridina

La ticlopidina y el clopidogrel son derivados de tienopiridinas que inhiben irreversiblemente la P2Y<sub>12</sub> de ADP-receptor en la superficie plaquetaria. El perfil de seguridad más favorable de clopidogrel lo ha llevado a ser la tienopiridina de elección. Se ha demostrado extensamente que existe una amplia variabilidad en la respuesta a clopidogrel. No hay estudios específicos de farmacogenética con ticlopidina. La mayoría de los estudios se desarrollaron en otros agentes antiplaquetarios, y los resultados son ciertamente contradictorios (Tabla 1). El primer estudio para evaluar la farmacogenética de clo-

pidogrel fue realizado por Angiolillo *et al.*<sup>(8)</sup>, en el que se examinó el polimorfismo de GP IIIa. Sin embargo, los efectos moduladores de este polimorfismo sobre la respuesta de clopidogrel se limitaron a la fase aguda del tratamiento, ya que no se observaron diferencias en los pacientes en terapia de mantenimiento<sup>(9)</sup>.

El efecto de los polimorfismos de otros receptores de membrana de las plaquetas en la respuesta a clopidogrel ha sido evaluado. Se ha descrito que C807T modula la agregación plaquetaria y los efectos antiagregantes plaquetarios del clopidogrel<sup>(10)</sup>, por lo que portadores del alelo T podrían tener mayor riesgo trombótico. Sin embargo, estos resultados no se confirmaron posteriormente. Otro potencial modulador de los efectos de clopidogrel es la proteasa activada por el receptor 1 (PAR-1), el receptor de la trombina en la superficie de la plaqueta. Se ha mostrado que -14 A> T se asocia con mayor reactividad plaquetaria antes y después de la administración de clopidogrel<sup>(11)</sup>.

Dado que el receptor P2Y12 de ADP es la diana de clopidogrel, varios estudios han investigado el papel potencial de las variaciones de la secuencia del gen de este receptor en respuesta a clopidogrel. Fontana *et al.* identificaron dos haplotipos (H1 y H2)<sup>(12)</sup>. El haplotipo H2 se asoció con una mayor agregación plaquetaria inducida por ADP en una cohorte de voluntarios sanos no medicados. Numerosas investigaciones adicionales ha corroborado un efecto funcional de polimorfismos de P2Y12 en la respuesta a clopidogrel o en el impacto clínico<sup>(13)</sup>. El clopidogrel es un profármaco que requiere la oxidación por el citocromo P450 (CYP) para generar un metabolito activo, siendo CYP3A4 el principal responsable. Las variantes genéticas de esta enzima en la respuesta a clopidogrel fueron las primeras en ser evaluadas, con resultados igualmente contradictorios. Estudios posteriores han evaluado la influencia de los polimorfismos de otros CYP sobre la respuesta de clopidogrel. De éstos, CYP2C19 demostró ser el más relevante con hallazgos consistentes en la bibliografía. La mayor prevalencia de la CYP2C19\*2 (alelo nulo) entre los asiáticos podría explicar por qué la prevalencia de respuesta subóptima a clopidogrel es mayor en japoneses que en caucásicos<sup>(14)</sup>. Por último, la absorción de clopidogrel y, por tanto, la formación de metabolitos activos, ha demostrado estar disminuida por flujo de salida mediado por P-gp y estar influenciado por el genotipo C3435T (MDR1)<sup>(15)</sup>, lo que sugiere que la tasa de metabolización de clopidogrel varía entre los individuos y puede estar determinado genéticamente.

### **Inhibidores GP IIb/IIIa**

La relevancia de la GP IIb/IIIa en la activación y agregación plaquetarias ha fomentado el desarrollo de inhibidores de GP IIb/IIIa como potentes fármacos anti-

plaquetas demostrando consistentemente su utilidad en pacientes de alto riesgo con síndrome coronario agudo (SCA). Algunos autores han evaluado el papel del polimorfismo PIA2 sobre los efectos de estos inhibidores, con resultados controvertidos. Así, se ha sugerido que el alelo PIA2 tiene menor inhibición de las plaquetas en los portadores<sup>(16)</sup>, aunque otros estudios no encontraron este efecto significativo del genotipo en la inhibición plaquetaria.

---

## **Anticoagulantes**

### **Heparina no fraccionada**

La mayoría de los estudios de farmacogenética en heparina se han relacionado con trombocitopenia inducida por heparina (HIT) y sus complicaciones tromboembólicas (Tabla 2). Recientemente, se ha propuesto que el polimorfismo PIA2 de GP IIIa puede modular los efectos protrombóticos de HIT. Sin embargo, los datos de esta asociación no se han confirmado. También hay datos controvertidos sobre el efecto del polimorfismo del receptor plaquetario FcγRIIA H131R y de polimorfismos del factor 4 plaquetario en HIT.

### **Anticoagulantes orales**

El inicio del tratamiento con antivitaminas K (AVK) se asocia con una de las mayores tasas de eventos adversos asociados a un solo medicamento. Hasta la mitad de los pacientes con fibrilación auricular sin contraindicación para la terapia con warfarina, que se encuentran en alto riesgo de accidente cerebrovascular (riesgo anual > 4%), no están sometidos a terapia anticoagulante debido a la percepción del riesgo asociado con este tipo de tratamiento, tanto por los pacientes como por los profesionales de la salud. Actualmente, algunas plataformas comerciales incorporan el genotipo de los polimorfismos que afectan a la dosis de AVK, además de datos clínicos, fisiológicos y factores ambientales, lo que parece una estrategia prometedora para predecir la dosis estable de forma individualizada. Así, el genotipo CYP2C9 predice ~ 10% y el genotipo VKORC1 hasta el 25% de la variabilidad en la dosis de AVK. La importancia de este efecto farmacogenético fue reconocida por la Food and Drug Administration (FDA) hace unos años. Sin embargo, es importante señalar que todos los datos conocidos sólo explican el 45-55% de la variante de la dosis total<sup>(17)</sup>. Recientemente, estudios de exploración del genoma completo (GWAS) han constatado que ningún otro gen va a tener un peso similar a CYP2C9 o VKORC1. Estos datos no descartan, sin embargo, la contribución de menor importancia de otros

Tabla 2. Polimorfismos genéticos relacionados con la farmacogenética de drogas anticoagulantes y fibrinolíticas

	Polimorfismo	Efecto funcional	Efecto clínico
<b>Heparina no fraccionada</b>			
Glicoproteína IIIa	PI <sup>A</sup> (Pro33Leu)	No hay datos funcionales	Datos controvertidos
Fc $\gamma$	RIIa-R-H131	Datos controvertidos	Datos controvertidos
<b>Anticoagulantes orales</b>			
Citocromo P450	CYP2C9	Menor actividad enzimática	Respuesta anticoagulante inestable Asociado con complicaciones hemorrágicas
Vitamin K epoxide reductase (VKOR)	VKORC1 (haplotipos)	Determina niveles de proteína (ARNm)	Modifica los requerimientos de dosis
<b>Fibrinolíticos</b>			
MMP-9	C-1562T	Sin efecto	Sin asociación clínica
Glicoproteína IIIa	PI <sup>A</sup> (Pro33Leu)	Sin efecto	Sin asociación clínica
Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	4G/5G	No determinado	Sin asociación clínica
Factor XIII	Val34Leu	Diferencias en resistencia al coágulo	Menor eficiencia en fibrinólisis
Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI)	Thr325Ile	No determinado	Asociado con resistencia a recanalización de la arteria media cerebral
Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHF)	C677T	No determinado	La homocigosis se asocia con infarto arterial relacionado con oclusión persistente
Angiotensin converting enzyme	I/D	No determinado	La homocigosis se asocia con recanalización

genes, como GGCX, APO E, MDR1, CYP4F2 o calumena, que también se han descrito. La controversia sobre la relación entre estos nuevos factores genéticos y la farmacogenética AVK merece estudios adicionales.

### Drogas fibrinolíticas

La terapia fibrinolítica se emplea para lograr la reperusión farmacológica y la restauración del flujo de una oclusión tanto venosa como arterial. Desafortunadamente, hasta el 40% de los pacientes tratados no alcanzan la reperusión óptima. Los factores identificados que participan en esta heterogeneidad interindividual son la edad, el retraso entre el inicio de los síntomas y el tratamiento fibrinolítico, el hábito tabáquico y el tamaño de la oclusión. En los últimos años, ha surgido un renovado interés sobre las iniciativas que podrían mejorar la eficacia del tratamiento fibrinolítico, incluidos los programas de la fibrinólisis prehospitalaria, los nuevos agentes terapéuticos (tenecteplasa, por ejemplo) o nuevas estrategias de reperusión farmacológica (por ejemplo, mitad de la dosis con anti-GP IIb/IIIa o adyuvantes como clopidogrel).

Pocos estudios han analizado la influencia de factores genéticos en la eficacia del tratamiento fibrinolítico (Tabla 2). Un estudio analiza el papel del polimorfismo C-1562T de gen metaloproteinasa-9 en la transformación hemorrágica del ictus después del tratamiento fibrinolítico con resultados negativos<sup>(16)</sup>. Del mismo modo, los resultados negativos se han encontrado en

otros contextos clínicos en relación al polimorfismo PI<sup>A</sup> de GPIIb/IIIa y al 4G/5G de PAI-1.

El cambio Val34Leu del FXIII juega un papel clave en la estabilidad y la estructura del coágulo de fibrina y ha sido evaluado en la respuesta individual a la terapia fibrinolítica. El polimorfismo Val34Leu afecta la función de FXIII mediante el aumento de la tasa de activación FXIII por la trombina, que se traduce en una tasa mayor y más rápida de la estabilización de la fibrina. En un estudio retrospectivo de pacientes tras un infarto de miocardio prematuro, nuestro grupo observó que los portadores de Leu34 podrían mostrar más “resistencia” a la terapia fibrinolítica<sup>(19)</sup>. Posteriormente, estudiamos de forma prospectiva pacientes de dos poblaciones europeas diferentes sometidos a fibrinólisis. En un análisis multivariado, la fibrinólisis en los portadores del alelo Leu34 fue significativamente menos eficaz. Además, observamos que la combinación simultánea de un alelo Leu34 y no-fumador aumenta significativamente el riesgo de menor eficacia de la fibrinólisis. En consecuencia, nuestro estudio apoya que la combinación de factores genéticos y ambientales puede explicar la heterogeneidad en la eficacia de la terapia fibrinolítica. Otros hallazgos con implicaciones en la práctica clínica son los derivados de un estudio realizado por nuestro grupo evaluando los efectos adversos secundarios del tratamiento trombolítico en ictus. Así, los pacientes Val34 y fibrinógeno bajo (< 3,6 g/L) mostraron los mejores resultados clínicos. Por el contrario, los portadores de Leu34 y altos niveles de fibrinógeno no mostraron respuesta clínica<sup>(20)</sup>.

En los últimos años, se han relacionado otros polimorfismos con la eficacia del tratamiento fibrinolítico, como el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina, TAFI, Thr325Ile, metilentetrahidrofolato reductasa C677T y la enzima convertidora de angiotensina. Estudios en otras poblaciones aclararían el papel de la modulación genética sobre la eficacia de la terapia de recanalización farmacológica con agentes fibrinolíticos.

## Conclusiones

A pesar de ser un campo relativamente nuevo en medicina, la farmacogenética emerge como una disciplina relevante que ayudará a encontrar el tratamiento más adecuado para cada paciente, aumentar la eficacia y seguridad de un medicamento determinado. Aquí hemos revisado los polimorfismos más importantes que se han asociado con los tratamientos antitrombóticos más habituales. Destacamos la importancia de identificar a los individuos en los que los beneficios clínicos potenciales pueden ser limitados como resultado de una respuesta inadecuada sobre la base de un perfil genético específico. En la práctica clínica, todos los pacientes son diferentes y la determinación de la base genética de tal heterogeneidad ayudará a reemplazar protocolos generales con regímenes de tratamientos específicos e individualizados. La farmacogenética facilitará el desarrollo de la medicina personalizada.

## Referencias bibliográficas

- Clemetson KJ. Platelet receptors and their role in diseases. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 253-60.
- Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, et al. Platelet GP IIIa Pl(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 2000; 101: 1013-8.
- Corral J, González-Conejero R, Rivera J, Ortuño F, Aparicio P, Vicente V. Role of the 807 C/T polymorphism of the alpha2 gene in platelet GP Ia collagen receptor expression and function: effect in thromboembolic diseases. *Thromb Haemost* 1999; 81: 951-6.
- Patrono C, García Rodríguez LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2373-83.
- González-Conejero R, Rivera J, Corral J, et al. Biological assessment of aspirin efficacy on healthy individuals: heterogeneous response or aspirin failure? *Stroke* 2005; 36: 276-80.
- Jefferson BK, Foster JH, McCarthy JJ, et al. Aspirin resistance and a single gene. *Am J Cardiol* 2005; 95: 805-8.
- Undas A, Sydor WJ, Brummel K, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. Aspirin alters the cardioprotective effects of the factor XIII Val34Leu polymorphism. *Circulation* 2003; 107: 17-20.
- Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, et al. PlA polymorphism and platelet reactivity following clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stent implantation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15: 89-93.
- Angiolillo DJ, Bernardo E, Ramirez C, et al. Polymorphisms of the GP IIIa and P2Y12 receptors and modulation of antiplate-

- let effects of combined aspirin and clopidogrel treatment. *Circulation* 2004 (Suppl.); 110: abstract 2013.
- Angiolillo DJ, Fernández Ortiz A, Bernardo E, et al. Variability in platelet aggregation following sustained aspirin and clopidogrel treatment in patients with coronary heart disease and influence of the 807C/T polymorphism of the glycoprotein Ia Gene. *Am J Cardiol* 2005; 96: 1095-9.
  - Smith SM, Judge HM, Peters G, et al. PAR-1 genotype influences platelet aggregation and procoagulant responses in patients with coronary artery disease prior to and during clopidogrel therapy. *Platelets* 2005; 16: 340-5.
  - Fontana P, Dupont A, Gandrille S, et al. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003; 108: 989-85.
  - Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. Lack of association between the P2Y12 receptor gene polymorphism and platelet response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 2005; 116: 491-7.
  - Hoshino K, Horiuchi H, Tada T, et al. Clopidogrel resistance in Japanese patients scheduled for percutaneous coronary intervention. *Circ J* 2009; 73: 336-42.
  - Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, et al. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80: 486-501.
  - Wheeler GL, Braden GA, Bray PF, Marciniak SJ, Mascelli MA, Sane DC. Reduced inhibition by abciximab in platelets with the PlA2 polymorphism. *Am Heart J* 2002; 143: 76-82.
  - Perez-Andreu V, Roldán V, Lopez-Fernandez MF, et al. Pharmacogenetics of acenocoumarol in patients with extreme dose. *J Thromb Haemost* 2010, 8: 1012-7.
  - Montaner J, Fernández-Cadenas I, Molina CA, et al. Safety profile of tissue plasminogen activator treatment among stroke patients carrying a common polymorphism (C-1562T) in the promoter region of the matrix metalloproteinase-9 gene. *Stroke* 2003; 34: 2851-5.
  - Roldán V, Corral J, Marín F, et al. Role of factor XIII Val34Leu polymorphism in patients <45 years of age with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2003; 91: 1242-5.
  - Marín F, González-Conejero R, Lee KW, 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.

## NOVEDADES EN LA GENÉTICA DE ENFERMEDADES MONOGÉNICAS HEMOSTÁSICAS

F. ESPAÑA<sup>1</sup>, P. MEDINA<sup>1</sup>, S. NAVARRO<sup>1</sup>,  
E. BONET<sup>1,2</sup>, L. MARTOS<sup>1</sup>, A. MOSCARDÓ<sup>1</sup>,  
A. ESTELLÉS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación; <sup>2</sup> Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario La Fe. Valencia

## Introducción

La enfermedad monogénica es aquella producida por la alteración de un único gen. Según esta definición, ni la trombosis ni la hemorragia son estrictamente enfermedades monogénicas, sino síndromes poligénicos y

multifactoriales. Sin embargo, existen deficiencias de factores de la coagulación, como la hemofilia, o de inhibidores de estos factores, como las deficiencias de proteína C (PC), proteína S (PS) o antitrombina (AT), que se consideran como enfermedades monogénicas.

## Enfermedades monogénicas

Las enfermedades monogénicas se transmiten según los patrones hereditarios mendelianos como: 1) **enfermedad autosómica recesiva**, para cuya manifestación se necesitan 2 copias del gen mutado; 2) **enfermedad autosómica dominante**, en la que sólo se necesita una copia mutada del gen para que se manifieste la enfermedad; y 3) **enfermedad ligada al cromosoma X**, en la que el gen mutado se localiza en el cromosoma X.

Entre las enfermedades monogénicas relacionadas con la hemostasia están la hemofilia, la enfermedad de Glanzmann, la enfermedad de von Willebrand (EvW), las deficiencias de inhibidores de la coagulación como PC, PS y AT.

## La trombosis venosa hereditaria como enfermedad poligénica

El término trombofilia, definido como la tendencia a desarrollar trombosis venosa entre sujetos de la misma familia, fue establecido en 1956 por Jordan y Nandorff<sup>(1)</sup>. Tras la identificación de deficiencias de los inhibidores de la coagulación AT<sup>(2)</sup>, PC<sup>(3)</sup> y PS<sup>(4)</sup> asociadas a trombosis familiar, se estableció la idea de que la trombosis venosa era una enfermedad monogénica. Sin embargo, a medida que se diagnosticaban más casos, se comprobó que la incidencia de trombosis en los individuos con estas deficiencias era muy baja (Tabla 1) y que la mayoría de los portadores cursaban sin manifestación clínica de trombosis. Estos datos hicieron sospechar de la existencia de otras alteraciones génicas que modularan la expresión clínica. De hecho, hasta el año 1994 se identificaron nuevas mutaciones raras asociadas con el tromboembolismo venoso (TEV). Pero fue en 1994 y 1996, cuando el grupo del doctor Bertina en Leiden (Holanda) identificó dos nuevos polimorfismos procoagulantes, el factor V Leiden (FVL)<sup>(5)</sup> y la protrombina (PT) 20210A<sup>(6)</sup>, cuando comenzó a asentarse el concepto de que la trombosis era una enfermedad poligénica y multifactorial.

## Enfermedades monogénicas asociadas a tromboembolismo venoso

### Deficiencias de proteínas C y S

Las deficiencias de PC y PS son enfermedades monogénicas con herencia autosómica recesiva. Los pacientes con deficiencia homocigota o doble heterocigota cursan con trombosis masivas tras el nacimiento<sup>(7,8)</sup> y necesitan tratamiento anticoagulante de por vida. Sin embargo, los portadores heterocigotos son, en su mayor parte, asintomáticos, especialmente los deficientes de PC, aunque presentan un incremento del riesgo de TEV<sup>(3,4)</sup>, que se manifiesta sobre todo cuando se combinan con otros defectos congénitos o adquiridos.

La PC circula como un zimógeno inactivo, pero se han detectado niveles circulantes de PC activada (APC) *in vivo*. Estos niveles están, en gran medida, determinados genéticamente<sup>(9)</sup> y los individuos con niveles de APC reducidos tienen un riesgo aumentado de TEV<sup>(10)</sup>. Se han descrito cuatro haplotipos (H) en el gen del receptor endotelial de la PC (EPCR). De ellos, el H1 se asocia con un aumento de los niveles de APC circulante y una reducción del riesgo de TEV<sup>(11,12)</sup> y arterial<sup>(13)</sup>, mientras que el H3 se asocia con un aumento de los niveles circulantes de EPCR y un mayor riesgo de TEV<sup>(14,15)</sup>.

La PS actúa como un cofactor de la PC en la inactivación de los factores Va y VIIIa. En un estudio en el que se analizaron dos series de familias con deficiencia de PS tipo I (cohorte 1; 35 probandos y 155 familiares) y tipo III (cohorte 2; 52 probandos y 241 familiares), se concluyó que, mientras la deficiencia tipo I es una enfermedad monogénica, como ocurre con la deficiencia tipo II, causada por mutaciones en el gen de la PS, la deficiencia tipo III es una enfermedad compleja y heterogénea, con ausencia de mutaciones en la mayoría de los pacientes<sup>(16)</sup>.

### Deficiencia de antitrombina

Recientemente se ha descrito una nueva alteración en el gen de la AT, Ala384Ser, con características interme-

Tabla 1. Prevalencia de alteraciones de la coagulación y riesgo tromboembólico

Factor de riesgo	Prevalencia en población general	Prevalencia en pacientes con trombofilia	Incidencia de trombosis
Deficiencia de proteína C	0,2%	4%	2% (1/50)
Deficiencia de proteína S	0,1%	4%	4% (1/25)
Deficiencia de antitrombina	0,04%	2%	10% (1/10)
Factor V Leiden	3-5%	25%	0,62% (1/160)
Protrombina 20210A	2-4%	12%	0,4% (1/250)

días entre un polimorfismo y una mutación, con una frecuencia del 0,2% en la población general<sup>(17)</sup>. Esta alteración genética produce una proteína con menor actividad anticoagulante, lo que aumenta de forma significativa el riesgo de trombosis venosa (OR = 10, -2,2-42,5-) y es responsable por sí sola de la mayoría de las deficiencias de este potente anticoagulante.

### **Deficiencia de proteína Z e inhibidor de proteína Z**

El inhibidor de proteasa dependiente de proteína Z (ZPI) es una serpina que parece tener un importante papel anticoagulante<sup>(18)</sup>. Se han descrito dos mutaciones que producen un codón de parada prematura, asociadas a un aumento del riesgo trombótico. Una de ellas es la Trp303Stop, identificada en el 4% de los pacientes con TEV en Nueva Zelanda<sup>(19)</sup>. La otra es la Arg67Stop, un polimorfismo que incrementa 3 veces el riesgo trombótico<sup>(20)</sup>.

La proteína Z (PZ) es una proteína dependiente de la vitamina K que actúa como un cofactor del ZPI en la inhibición del factor Xa. Varios polimorfismos en el gen de la PZ influyen en los niveles de PZ en plasma y el riesgo de trombosis<sup>(21)</sup>. En un reciente metaanálisis se revisó la relación entre los niveles de PZ y trombosis<sup>(22)</sup>. El estudio incluía 28 estudios caso-control (33 cohortes de pacientes), con 4.218 pacientes con enfermedades trombóticas y 4.778 controles. Se observó que bajos niveles de PZ estaban asociados con un aumento del riesgo de TEV (2,2; 1,2-4,0) y arterial (2,7; 1,6-4,5).

### **Factor V Leiden y protrombina 20210A**

Las mutaciones FVL y PT 20210A son dos factores de riesgo de TEV frecuentes. Sin embargo, no pueden ser consideradas como enfermedades monogénicas, dada la baja incidencia de TEV en los portadores. No obstante, podemos considerarlos como alteraciones génicas principales que, junto a otras mutaciones o factores adquiridos, pueden elevar considerablemente el riesgo de TEV dada su gran prevalencia en la población. Así, en un análisis de 8 estudios caso-control que incluía 2.310 pacientes y 3.204 controles portadores de una o las dos mutaciones<sup>(23)</sup>, los OR para el TEV fueron de 4,9 (4,1-5,9) para el FVL; de 3,8 (3,0-4,9) para la PT 20210A; y de 20,0 (11,1-36,1) para los doble heterocigotos. Además, el OR para la asociación del FVL y de la PT 20210A con anticonceptivos orales fue de 10,2 (5,7-18,4) y 7,1 (3,4-15,0), respectivamente, comparado con el de las no portadoras usuarias de anticonceptivos (2,3; 1,7-3,0). Dada la gran prevalencia de estos dos polimorfismos, estos resultados ponen de relieve la importancia de que los portadores eviten en lo posible los factores de riesgo ad-

quiridos. Así, un estudio del Registro Informatizado de Pacientes con Enfermedad Tromboembólica (RIETE)<sup>(24)</sup> comparó las características clínicas de pacientes portadores de FVL, de PT 20210A o sin trombofilia, tras un primer episodio de TEV. De los 22.428 pacientes registrados, 3.000 tenían un estudio de trombofilia. De ellos, 345 (11,5%) eran portadores del FVL y 261 (8,7%) de la PT 20210A. El 62% de las mujeres y el 40% de hombres con TEV que portaban alguno de estos dos polimorfismos tenían además algún factor de riesgo adicional, siendo los más prevalentes en las mujeres los anticonceptivos (67%) y el embarazo (63%).

---

## **Enfermedades monogénicas asociadas a trombosis arterial**

### **Factor V Leiden y protrombina 20210A**

En un estudio en el que se analizó la asociación del FVL y la PT 20210A con el riesgo de infarto de miocardio antes de los 45 años<sup>(25)</sup>, el 2,6% de los pacientes y el 1,7% de los controles eran portadores de FVL (OR ajustado para los clásicos factores de riesgo cardiovascular: 1,7; 1-1-2,4). Sin embargo, la PT 20210A no se asoció con el riesgo de infarto de miocardio.

Además, la presencia de FVL se ha asociado con ictus en niños, pero raramente en adultos. Un estudio analizó esta asociación en adultos, mediante un metaanálisis que incluía 18 estudios caso-control en adultos con menos de 51 años<sup>(26)</sup>. El FVL se encontró en 154 de los 2.045 casos (7,5%) y 217 de los 5.307 controles (4,1%) (OR: 2,0; 1,6-2,5). Sin embargo, dada la gran heterogeneidad entre los estudios, solamente se observó una asociación entre el ictus y la presencia de FVL en aquellos estudios con una fuerte selección de pacientes con trombofilia.

---

## **Enfermedades monogénicas asociadas a enfermedad hemorrágica**

### **Hemofilia**

La hemofilia se caracteriza por una grave deficiencia de factor VIII (hemofilia A) o factor IX (hemofilia B). Durante los últimos 60 años, el tratamiento de estos pacientes ha consistido en la terapia de sustitución del factor correspondiente, primero con productos derivados de plasma y luego con factores recombinantes. Sin embargo, estos productos requieren una administración continuada y son caros. Por ello, la terapia génica se ha planteado como una estrategia alternativa a la actual, dado el carácter monogénico de la enfermedad. Los modelos caninos de hemofilia y de deficiencia de factor de von Willebrand (FvW) y de factor VII en pe-

ros han demostrado la viabilidad de esta terapia. Pero recientemente se ha visto que, en humanos, se produce una respuesta inmune hacia el vector de transferencia utilizado, por lo que habrá que esperar a que se resuelva este problema<sup>(27)</sup>.

### **Deficiencia de factor V**

El factor V está presente en plasma y plaquetas y es esencial para el proceso de coagulación. De hecho, los ratones con deficiencia total de factor V son inviábiles. Sin embargo, los pocos casos de deficiencia de factor V severa en humanos son raramente fatales. Aunque se desconocen las razones de esta variabilidad fenotípica, varios estudios coinciden en que la presencia de factor V plaquetario puede explicar estas observaciones. Además, se ha visto que los niveles del inhibidor de la vía del factor tisular están reducidos en plasma deficiente de factor V, resultando en una generación de trombina aumentada, lo que ayudaría a proteger frente a la hemorragia a estos individuos<sup>(28)</sup>.

### **Factor de von Willebrand y ADAMTS-13**

El FvW es una glicoproteína multimérica de alto peso molecular con un importante papel en la hemostasia primaria, mediando la adhesión y agregación plaquetaria y estabilizando al factor VIII. Su deficiencia causa la EvW, el trastorno hemorrágico hereditario más común. La caracterización genética de la EvW puede ser útil para su diagnóstico. Mientras que los tipos 2 y 3 de la EvW han sido relativamente bien caracterizados, la caracterización del tipo 1 es más complicada y no siempre se han identificado mutaciones asociadas a él. En estudios de grandes cohortes se ha observado que únicamente se han identificado mutaciones en el gen del FvW asociadas con la EvW tipo 1 en un pequeño número de familias, lo que sugiere que otras regiones del ADN diferentes al gen del FvW pueden ser las responsables de este trastorno<sup>(29)</sup>. En un estudio en el que se analizó el espectro de mutaciones causales de la EvW tipo 1 en la población sueca, únicamente se identificó alguna mutación en el 56% de los pacientes<sup>(30)</sup>. Recientemente se ha identificado una nueva mutación silenciosa que da lugar a una nueva variante del FvW generada por *splicing* alternativo y que está asociada con la EvW tipo 1, la cual estaba presente en pacientes a los que previamente no se les había encontrado ninguna alteración molecular<sup>(31)</sup>.

La metaloproteasa denominada ADAMTS-13 pertenece a una familia de proteasas cinc-dependientes que desempeñan un papel importante en varios procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la artritis y el cáncer. La ADAMTS-13 proteoliza al FvW, parti-

cipando en la fisiopatología de la púrpura trombótica trombocitopénica. También participa en ciertas formas de EvW, en especial algunas formas del subtipo 2A, que muestran una hipersusceptibilidad a esta enzima. Además, puede ejercer un importante papel en la EvW adquirida asociada a la estenosis valvular grave, como consecuencia del aumento de su función debido al elevado estrés circulatorio. Por ello, no sólo participa en el marco de la trombosis, sino también en el de las diátesis hemorrágica<sup>(32)</sup>.

### **Defectos plaquetarios**

Los problemas hemorrágicos asociados directamente a defectos plaquetarios son relativamente habituales en la práctica clínica<sup>(33,34)</sup>. Sin embargo, en pocos casos se conocen las bases moleculares responsables del defecto en la función plaquetaria observado en el laboratorio. Además, incluso las variantes más graves y estudiadas, como la tromboastenia de Glanzmann, el síndrome de Bernard-Soulier o las deficiencias de almacenamiento de gránulos, son extremadamente poco frecuentes. Los defectos plaquetarios suelen clasificarse en varios grupos: a) adhesivos; b) agregatorios; c) almacenamiento de gránulos; d) transmisión de señales; e) regulación del citoesqueleto; y f) defectos en la actividad procoagulante de las plaquetas.

#### *Defectos en la adhesión plaquetaria*

El síndrome de Bernard-Soulier se caracteriza por trombocitopenia (< 20.000 plaquetas) y plaquetas gigantes con múltiples vacuolas citoplasmáticas. La base de la enfermedad es el defecto en la adhesión al FvW y en la agregación a la trombina debido a defectos cualitativos o cuantitativos en el complejo GPIb-IX-V. Este complejo es generado por la combinación de 4 genes separados (GPIBA, GPIBB, GP9 y GP5) cuyos productos se asocian en el megacariocito para dar lugar al complejo presente en la membrana plaquetaria. Mutaciones en cualquiera de estos genes provocan que el complejo no se forme o no se traslade correctamente a la membrana. Existen también raras ocasiones en que el complejo está presente en la membrana pero no es funcional.

#### *Defectos en la agregación plaquetaria*

La enfermedad de Glanzmann o tromboastenia es una enfermedad hereditaria con un patrón de herencia de tipo autosómico recesivo. Cursa con un recuento de plaquetas normal, pero éstas aparecen aisladas sobre el frotis de sangre y no agregan con ADP. El tiempo de

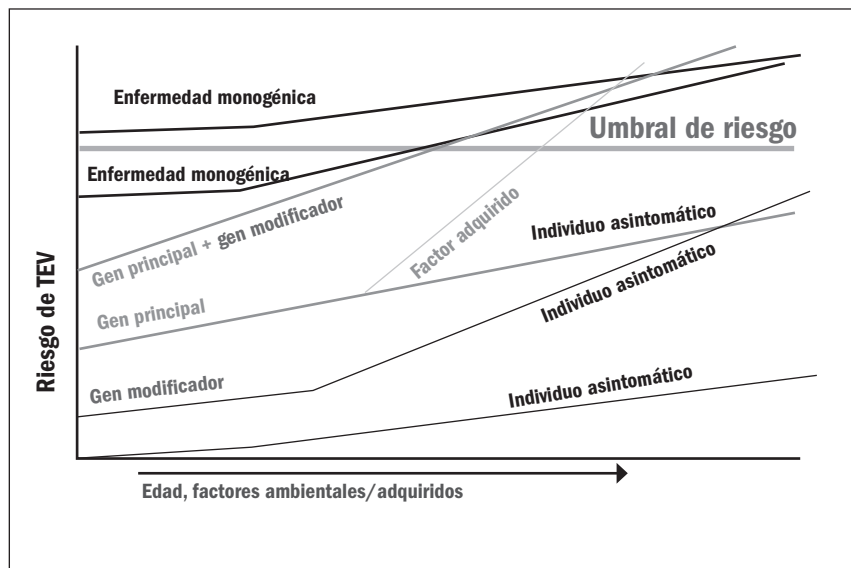


Figura 1. Trombosis venosa como enfermedad poligénica multifactorial. TEV: tromboembolismo venoso.

PKC $\theta$ ) y defectos en el metabolismo del ácido araquidónico (PLA2, COX-1, TXA2 sintasa).

### Reorganización del citoesqueleto

El síndrome de Wiskott-Aldrich se encuentra ligado al cromosoma X, codificando la proteína WASP, la cual actúa como nexo de unión entre los sistemas de transmisión de señales y la reorganización del citoesqueleto. El defecto se caracteriza por deficiencias en la agregación, la liberación de gránulos, el metabolismo energético de la plaqueta, etc.

hemorragia está alargado y la retracción del coágulo está ausente o disminuida. La concentración de fibrinógeno plaquetario es baja. Mutaciones descritas en la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ <sup>(3)</sup> demuestran que esta integrina es importante para su formación y función, y están asociadas a perturbaciones hemostáticas severas. Así, tanto la mutación Asn2Asp en la región N-terminal del  $\beta$ -propeller<sup>(33)</sup> como la Leu718Pro<sup>(34)</sup> impiden la expresión de la integrina en la superficie plaquetaria, produciendo un fenotipo hemorrágico severo.

### Almacenamiento de gránulos

Constituye un grupo heterogéneo de patologías, que se pueden dividir entre aquellas con número reducido de gránulos, o gránulos con contenido disminuido, y aquellas con defectos en la liberación de gránulos, pese a que éstos sean correctos en contenido. Además, el defecto puede afectar tanto a los gránulos densos como a los gránulos  $\alpha$ . En algunos casos, se conoce el gen responsable del defecto, como en el caso del defecto de gránulos  $\alpha$  tipo Québec, con herencia autosómica dominante.

### Transmisión de señales

Se trata también de un grupo muy heterogéneo, en el que se incluyen defectos de receptores, como el receptor del TXA2, receptores del ADP (P2Y1 y P2Y12), receptores del colágeno (GPIa-IIa, GPVI, GPIV) y receptor de la epinefrina; defectos en proteínas G ( $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i1$ ); defectos en enzimas señalizadoras (PLC $\beta$ 2,

### Defectos en la actividad procoagulante de las plaquetas

El síndrome de Scott está causado por un defecto en la reorganización de los fosfolípidos de membrana en las plaquetas en respuesta a un estímulo, resultando en la disminución de la capacidad de las plaquetas de convertir la protrombina en trombina. El defecto puede estar localizado en una mutación en el transportador ABCA1.

Recientemente se han descrito una serie de defectos en factores de transcripción en los megacariocitos, como la deficiencia en CBFA2, que se ha asociado con problemas en la agregación o la liberación de gránulos. Además, existen toda una serie de defectos en los megacariocitos responsables de causar trombocitopenias. Estos incluyen defectos en factores de transcripción, defectos en la generación de megacariocitos y defectos en el citoesqueleto dando lugar a plaquetas gigantes, con mutaciones en el gen de la miosina-IIA.

### Corolario

La hipótesis de que la variabilidad genética individual puede desempeñar un papel determinante en el riesgo trombótico o hemorrágico resulta muy atractiva, sobre todo si se tiene en cuenta que los factores de riesgo conocidos no son capaces de justificar más del 30-50% de los casos de estas enfermedades. Se han descrito ya numerosas alteraciones genéticas de riesgo y la lista de genes candidatos no cesa de ampliarse. Nuestro conocimiento, sin embargo, adolece de importantes limitaciones. En la mayoría de los casos, la asociación con el riesgo o el fenotipo intermedio es muy modesta o está

en entredicho. A pesar de sus limitaciones, está tomando cuerpo la hipótesis de que el riesgo de padecer la enfermedad es función del número de polimorfismos desfavorables que porta un individuo. Así, un individuo puede ser asintomático a lo largo de su vida frente a una enfermedad, bien por no poseer ningún factor de riesgo o porque, en el caso de ser portador de alguna alteración en un gen principal o modificador, no alcanza el umbral de riesgo necesario (Figura 1). Sin embargo, los individuos con una enfermedad monogénica, desde su nacimiento están cerca o superan el umbral de riesgo, al menos los homocigotos en el caso de enfermedad recesiva, y desarrollarán la enfermedad a lo largo de su vida. Este escenario es mucho más complejo, puesto que, a su vez, existen polimorfismos que protegen de la enfermedad y que pueden modular la expresión clínica.

El efecto de las mutaciones en genes relacionados con una patología es importante y este hecho sugiere que el análisis del perfil genómico puede facilitar el diagnóstico de la susceptibilidad genética individual a sufrir dicha patología.

### Agradecimientos

*Este trabajo ha sido financiado, en parte, por ayudas del FEDER y del PN de I+D+I 2008-2011 (ISCIII PS09/00610), Red RECAVA (RD06/0014/0004), Consejería de Educación de la Generalitat Valenciana (Prometeo/2011/027) y Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe (2007-0185). Pilar Medina es Investigadora del SNS Miguel Servet (ISCIII CP09/00065).*

### Referencias bibliográficas

- Jordan FL, Nandorff A. The familial tendency in thromboembolic disease. *Acta Med Scand* 1956; 156: 267-75.
- Egeberg O. Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965; 13: 516-20.
- Griffin JH, Evatt B, Zimmermann TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; 68: 1370-3.
- Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 1984; 64: 1297-300.
- Bertina RM, Koeleman BF, Koster T. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-7.
- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma P, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-703.
- Estellés A, García-Plaza I, Dasí A, Aznar J, Duart M, Sanz G, et al. Severe inherited "homozygous" protein C deficiency in a newborn infant. *Thromb Haemost* 1984; 52: 53-6.
- Mahasandana C, Suvatte V, Marlar RA, Manco-Johnson MJ, Jacobson LJ, Hathaway WE. Neonatal purpura fulminans associated with homozygous protein S deficiency. *Lancet* 1990; 335: 61-2.
- Soria JM, Navarro S, Medina P, Souto R, Buil A, Estellés A, et al. Heritability of plasma concentrations of activated protein C in a Spanish population. *Blood Coag Fibrinol* 2009; 20: 17-21.
- España F, Vayá A, Mira Y, Medina P, Estellés A, Villa P, et al. Low level of circulating activated protein C is a risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1368-73.
- Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Woodhams B, Mira Y, et al. Contribution of polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene to soluble endothelial protein C receptor and circulating activated protein C levels and thrombotic risk. *Thromb Haemost* 2004; 91: 905-11.
- Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Bertina RM, España F. Influence of the 4600A/G and 4678G/C polymorphisms in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene on the risk of venous thromboembolism in carriers of the FVL mutation. *Thromb Haemost* 2005; 94: 389-95.
- Medina P, Navarro S, Corral J, Zorio E, Roldán V, Estellés A, et al. Endothelial protein C receptor polymorphisms and risk of myocardial infarction. *Haematologica* 2008; 93: 1358-63.
- Sapoznik B, Reny JL, Gausem P, Emmerich J, Aiach M, Gandrille S. A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood* 2004; 103: 1311-8.
- Navarro S, Medina P, Mira Y, Estellés A, Villa P, Ferrando F, et al. Haplotypes of the ERPCR gene, prothrombin levels, and the risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A mutation. *Haematologica* 2008; 93: 885-91.
- Ten Kate MK, Platteel M, Mulder R, Terpstra P, Nicolaes GA, Reitsma PH, et al. PROS1 analysis in 87 pedigrees with hereditary protein S deficiency demonstrates striking genotype-phenotype associations. *Hum Mutat* 2008; 29: 939-47.
- Corral J, Hernandez-Espinosa D, Soria JM, Gonzalez-Conejero R, Ordonez A, Gonzalez-Porras JR. Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2007; 109: 4258-63.
- Corral J, González-Conejero R, Hernández-Espinosa D, Vicente V. Protein Z/Z-dependent protease inhibitor (PZ/ZPI) anticoagulant system and thrombosis. *Br J Haematol* 2007; 137: 99-108.
- Water N, Tan T, Ashton F, O'Grady A, Day T, Browett P, et al. Mutations within the protein Z-dependent protease inhibitor gene are associated with venous thromboembolic disease: a new form of thrombophilia. *Br J Haematol* 2004; 127: 190-4.
- Corral J, González-Conejero R, Soria JM, González-Porras JR, Perez-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.
- Han X, Fiehler R, Broze GJ Jr. Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor. *Blood* 2000; 96: 3049-55.
- Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Broze G, Fedeli S. A meta-analysis of potential risks of low levels of protein Z for diseases related to vascular thrombosis. *Thromb Haemost* 2010; 103: 749-56.
- 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. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001; 86: 809-16.
- Gadelha T, Roldán V, Lecumberri R, Trujillo-Santos J, del Campo R, Poggio R, RIETE Investigators. Clinical characteristics of patients with factor V Leiden or prothrombin G20210A and a first episode of venous thromboembolism. Findings from the RIETE Registry. *Thromb Res* 2010; 126: 283-6.
- Mannucci PM, Asselta R, Duga S, Guella I, Spreafico M, Lotta L, et al. The association of factor V Leiden with myocardial infarction is replicated in 1880 patients with premature disease. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2116-21.

26. Hamedani AG, et al. Meta-analysis of factor V Leiden and ischemic stroke in young adults: the importance of case ascertainment. *Stroke* 2010; 41: 1599-603.
27. Nichols TC, Dillow AM, Franck HW, Merricks EP, Raymer RA, Bellinger DA, et al. Protein replacement therapy and gene transfer in canine models of hemophilia A, hemophilia B, von willebrand disease, and factor VII deficiency. *LAR J* 2009; 50 (2): 144-67.
28. Mansour W, Einav Y, Hauschner H, Koren A, Seligsohn U, Rosenberg N. An  $\alpha$ IIb mutation in patients with Glanzmann thrombasthenia located in the N-terminus of blade 1 of the  $\beta$ -propeller (Asn2Asp) disrupts a calcium binding site in blade 6. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 192-200.
29. Jayo A, Conde I, Lastres P, Martínez C, Rivera J, Vicente V, et al. 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.
30. Johansson AM, Halldén C, Säll T, Lethagen S. Variation in the VWF Gene in Swedish Patients with Type 1 von Willebrand disease. *Ann Hum Genet* 2011; 75 (4): 447-55. doi: 10.1111/j.1469-1809.2011.00652.x.
31. Daidone V, Gallinaro L, Cattini MG, Pontara E, Bertomoro A, Pagnan A, et al. An apparently silent nucleotide substitution (c.7056C>T) in the von Willebrand factor gene is responsible for type 1 von Willebrand disease. *Haematologica* 2011; 96 (6): 881-7.
32. Batlle J, Pérez Rodríguez J, Torea JH, Loaurés E, Andón C, López Fernández MF. ADAMTS-13 y función del factor von Willebrand. *Haematologica* (ed. esp.) 2006; 91 (Suppl. 1): 251-9.
33. Rao AK, Jalagadugula G, Sun L. Inherited defects in platelet signaling mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 525-35.
34. Nurden P, Nurden AT. Congenital disorders associated with platelet dysfunctions. *Thromb Haemost* 2008; 99: 253-63.
35. Duckers C, Simioni P, Spiezia L, Radu C, Dabrilii P, Gavasso S, et al. Residual platelet factor V ensures thrombin generation in patients with severe congenital factor V deficiency and mild bleeding symptoms. *Blood* 2010; 115: 879-86.
36. Eikenboom J, Van Marion V, Putter H, Goodeve A, Rodeghiero F, Castaman G, et al. Linkage analysis in families diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, molecular and clinical markers for the diagnosis and management of type 1 VWD. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 774-82.

## COMPUTATIONAL AND *IN SILICO* GENETIC ANALYSIS IN VENOUS THROMBOSIS

C.Y. VOSSEN<sup>1,2</sup>, B.P.C. KOELEMAN<sup>1</sup>,  
E.G. BOVILL, F.R. ROSENDAAL<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Genetics; University Medical Center Utrecht, Netherlands. <sup>2</sup> Department of Clinical Epidemiology, Leiden University Medical Center, Netherlands. <sup>3</sup> Department of Thrombosis and Hemostasis, Leiden University Medical Center, Netherlands. <sup>4</sup> Eindhoven Laboratory for Experimental Vascular Medicine, Leiden University Medical Center, Netherlands

Venous thrombosis (VT) has an incidence of about 1 to 3 per 1,000 individuals per year in Western Countries and is a serious disorder with potential major

complications such as death from pulmonary embolism and the development of a disabling post-thrombotic syndrome. The susceptibility for VT is complex, involving multiple genetic and environmental risk factors<sup>(1)</sup>. The main strong genetic defects for VT are inherited deficiencies in the natural anticoagulants antithrombin, protein C and protein S, and the two common polymorphisms factor V Leiden and prothrombin G20210A<sup>(1)</sup>. These genetic risk factors explain, however, only a small part of the heritability of VT<sup>(2)</sup> indicating that a search for novel genetic risk factors for VT is still warranted. In recent years, common gene variants have been identified by studies focusing on common variants or haplotypes in one or a few candidate genes such as prothrombin 19911A>G, the factor V HR2 haplotype, factor VIII 94901C>G, fibrinogen gamma 10034C>T and factor XIII Val34Leu<sup>(3)</sup>. Unfortunately, most of these variants have a weak and inconsistent effect on VT<sup>(6)</sup>. A recent larger candidate gene genotyping effort including 19 682 gene-centric SNPs identified common SNPs located in F5, F11 (instead of the earlier published SNPs in CYP4V2), SERPINC1 and GP6 that modestly increase the risk of deep venous thrombosis 1.2 to 1.4-fold<sup>(4-6)</sup>. Findings for GP6 and CYP4V2 were replicated by Trégouet *et al.*<sup>(7)</sup>, who showed in the same paper the results from a genome wide association (GWA) study involving genotyping of approximately 300,000 SNPs in over 400 cases with an idiopathic VT before the age of 50 years and over 1,200 control individuals. Despite the fact that GWA studies are not limited to genes with a known role in the disease of interest, Trégouet *et al.* only found an association with VT for F5 and ABO<sup>(7)</sup>. GWA studies of intermediate phenotypes are also potential sources for novel genetic risk factors for VT as has been shown by Smith *et al.*, who recently found an independent association with VT for variants in the von Willebrand factor gene (VWF) and the syntaxin binding protein 5 gene (STXBP5) that had been associated in a GWA study with von Willebrand levels<sup>(8)</sup>.

Before GWA studies were possible, hypothesis-free genotyping studies were performed in families using short tandem repeat markers. Using this approach, we found in a large family with inherited protein C deficiency evidence for a gene interacting with protein C deficiency in increasing the VT risk, the cell adhesion molecule 1 (CADM1) gene located at chromosome 11<sup>(9)</sup>. This gene was identified after re-sequencing genes under the three linkage peaks (i.e., 10p12, 11q23, and 18p11.2-q11.2) that were identified in this family<sup>(9)</sup>. For efficiency reasons, we did not re-sequence all genes under the linkage peaks but only those with a role in inflammation, signaling, gene expression or RNA stability, or genes that provided additional coverage in regions with low cover-

age. By applying six computational candidate gene prioritization tools we investigated *in silico* which candidate genes would have been prioritized for the peak on chromosome 11q23<sup>(10)</sup>. These programs prioritize genes based on sequence data, literature mining, functional annotation data, expression data, pathway information and protein interaction data, which are derived from different web-based data sources. CADM1 was prioritized only by one of the six tools<sup>(10)</sup>. In general, disease gene prioritization tools rely heavily on available information explaining why CADM1 was not prioritized by most tools. First of all, the presence and function of CADM1 in endothelial cells has only been investigated since it was identified as a risk factor in the Vermont family<sup>(9)</sup>. In addition, CADM1 variants and protein C deficiency are probably not interacting via shared binding partners but the increased risk of thrombosis is thought to be the result of their respective role in maintaining normal endothelial barrier function. Re-sequencing of candidate genes under linkage peaks therefore still seems the method of choice, although more costly and time-consuming than computational prioritization of genes within linkage peaks. Future studies will have to elucidate whether CADM1 variants are also associated with VT risk outside the Vermont family in which it interacts with protein C deficiency. Another family-based study, the Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia (GAIT) project, found a linkage peak on chromosome 18 for activated protein C resistance and, pleiotropically, factor VIII and thrombosis near the chromosome 18 peak found in the protein C deficient family<sup>(11)</sup>. However, re-sequencing of genes in the chromosome 18 region in the protein C deficient family did not reveal novel disease genes<sup>(9)</sup>.

In summary, in recent years mostly common, but weak genetic risk factors for VT have been identified in genes already known to be involved in the coagulation system. The GWA study by Trégouet *et al.*<sup>(7)</sup> did not identify genetic risk factors outside the coagulation system. However, this study did not have enough power to detect ORs below 1.4<sup>(7)</sup>. Efforts to increase the power of the GWA study by increasing the number of individuals might lead to the identification of more gene variants. An even more powerful approach might be to perform pathway analyses rather than conventional single-marker association analyses. In GWA studies large numbers of SNPs are genotyped. As a consequence stringent statistical criteria have to be applied to minimize the number of false positive hits. Therefore, only the most significant associations will be reported, which likely represent only part of the genes contributing to complex diseases. Pathway analyses can be performed on available GWA study SNP data. An advantage of

the pathway approach is the gain of power by reducing the number of associations (associations are with pathways not with single genes, cf. cluster or principal component analysis<sup>(12)</sup>). The method takes multiple variants into account that might together have a large effect but individually will have low undetectable effects, which is in line with the idea that complex diseases result from the cumulative effect of different variants (i.e., genetic heterogeneity) in multiple interacting genes rather than the effect of single gene variants. Pathway analysis methods are still at the early stages of development, so caution should be taken when applying current programs and interpreting results. Hypothesis-free pathway selection is not yet possible: current methods therefore depend on *a priori* selected candidate pathways and rely on current biological knowledge. Although there are many pathway resources available to select pathways, results differ when using different resources as shown by Elbers *et al.*<sup>(13)</sup>. Problems that can be encountered are overlapping pathways when genes appear in more than one pathway, difficulties with assigning SNPs from a GWA panel to known genes, and difficulties with establishing pathway scores when large differences occur in pathway size and coverage of genes within pathways<sup>(14)</sup>.

Besides common variants, the identification of rare variants with a strong effect is of great interest. The ongoing development and cost-reduction of next-generation sequencing techniques provide an opportunity to extend our search for novel genetic risk factors for VT beyond common variants. However, the low prevalence of rare variants will limit our power to confirm associations with VT in currently available studies. One way to increase power is to combine the effects of multiple rare variants. An example of such a method is the weighted sum statistic described by Madsen BE *et al.*<sup>(15)</sup> in which rare variants are grouped according to genes and each individual is scored by a weighted sum of the variant counts. Common variants can also be included in this method after adjustments to avoid that the test will be dominated by common mutations. Computational predictions of the functional effect of amino acid changes can be incorporated as well thereby giving most weight to variants that are predicted to be functionally significant. Variants that are predicted to be functionally insignificant should not necessarily be neglected though. In the past decade, microRNAs have been recognized as critical regulators of gene expression<sup>(16)</sup>. MicroRNAs are non-coding conserved 20-30-nucleotide sequences that influence mRNA translation or degradation of protein-coding genes by binding to their target sites, which generally are located in the 3' untranslated region (UTR) of target genes<sup>(16)</sup>. Several studies have shown an effect

of variants in the 3'UTR region of target genes, presumably via influencing microRNA binding, on diseases such as Parkinson's disease, colorectal cancer, hypertension, breast cancer and childhood asthma<sup>(17)</sup>, but not for VT yet. A recent study did show the potential importance of microRNAs in the development of the coagulation system in neonate mice<sup>(18)</sup>. Also, Fort *et al.* tested 470 annotated human microRNA precursors for an effect on fibrinogen biosynthesis *in vitro* and identified 23 miRNAs down-regulating and 4 miRNAs up-regulating fibrinogen production<sup>(19)</sup>. To identify variants in the 3'UTR of genes involved in coagulation that might influence microRNA binding, several *in silico* algorithms can be used such as Patrocles and PolymiRTS that predict which genetic variants in microRNA target sites might influence binding of microRNAs<sup>(20)</sup>. Validation of the predicted *in silico* findings by epidemiological or *in vitro* studies is strongly recommended though. First of all, predictions made by the Patrocles or PolymiRTS algorithms for the effect of 3'UTR variants on microRNA binding can differ greatly. For example for the factor VII gene, Patrocles predicts that the A-allele of SNP rs2476324G>A disrupts binding to hsa-mir-593, whereas PolymiRTS predicts that the G-allele of the same SNP disrupts binding to hsa-mir-511. Furthermore, Patrocles predicts that rs3093250G>A influences binding to hsa-324-5p, whereas PolymiRTS predicts other SNPs to have an effect on microRNA binding: rs3093249:-/AA is predicted to influence binding to hsa-mir-593, rs3093251A>G to hsa-mir-933 and rs3093256 C>G to hsa-mir-146a. Secondly, one microRNA can target multiple genes and several microRNAs can target one gene, so the effect on protein levels of altered binding to one microRNA might be smaller than predicted.

In conclusion, the high heritability of VT has not been fully explained yet by currently identified genetic risk factors. Bioinformatic tools might enable us to incorporate biological information into genetic analyses as well as to perform *in silico* searches for novel genetic risk factors for VT. Different current *in silico* resources produce, unfortunately, different results and further development of *in silico* databases and computational tools is therefore of great importance, especially as the overwhelming amount of data coming from (whole) genome scans will preclude easy identification of genetic risk factors for complex diseases.

### Acknowledgements

C.Y. Vossen was supported by a Horizon grant (93519005) from the Netherlands Genomics Initiative.

### References

- Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353: 1167-73.
- Bertina RM. Genetic approach to thrombophilia. *Thromb Haemost* 2001; 86: 92-103.
- Bezemer ID, Rosendaal FR. Predictive genetic variants for venous thrombosis: what's new? *Semin Hematol* 2007; 44: 85-92.
- Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, et al. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *JAMA* 2008; 299: 1306-14.
- Bezemer ID, Bare LA, Arellano AR, Reitsma PH, Rosendaal FR. Updated analysis of gene variants associated with deep vein thrombosis. *JAMA* 2010; 303: 421-2.
- Li Y, Bezemer ID, Rowland CM, Tong CH, Arellano AR, Catanese JJ, et al. Genetic variants associated with deep vein thrombosis: the F11 locus. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1802-8.
- Trégouët DA, Heath S, Saut N, Biron-Andreani C, Schved JF, Pernod G, et al. Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. *Blood* 2009; 113: 5298-303.
- Smith NL, Rice KM, Bovill EG, Cushman M, Bis JC, McKnight B, et al. Genetic variation associated with plasma von Willebrand factor levels and the risk of incident venous thrombosis. *Blood* 2011; 117 (22): 6007-11.
- Hasstedt SJ, Bezemer ID, Callas PW, Vossen CY, Trotman W, Hebbel RP, et al. Cell adhesion molecule 1: a novel risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2009; 114: 3084-91.
- Vossen CY, Elbers CC, Koeleman BP, Rosendaal FR, Bovill EG. Computational candidate gene prioritization for venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1869-71.
- Soria JM, Almasy 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.
- Vossen CY, Callas PW, Hasstedt SJ, Long GL, Rosendaal FR, Bovill EG. A genetic basis for the interrelation of coagulation factors. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1930-5.
- Elbers CC, van Eijk KR, Franke L, Mulder F, van der Schouw YT, Wijmenga C, et al. Using genome-wide pathway analysis to unravel the etiology of complex diseases. *Genet Epidemiol* 2009; 33: 419-31.
- Cantor RM, Lange K, Sinsheimer JS. Prioritizing GWAS results: a review of statistical methods and recommendations for their application. *Am J Hum Genet* 2010; 86: 6-22.
- Madsen BE, Browning SR. A groupwise association test for rare mutations using a weighted sum statistic. *PLoS Genet* 2009; 5: e1000384.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136: 642-55.
- Sethupathy P, Collins FS. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends Genet* 2008; 24: 489-97.
- 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.
- Fort A, Borel C, Migliavacca E, Antonarakis SE, Fish RJ, Neerman-Arbez M. Regulation of fibrinogen production by microRNAs. *Blood* 2010; 116: 2608-15.
- Mishra PJ, Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics* 2009; 10: 399-416.