

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

DETECCIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN  
COMPONENTES DE LA VÍA DE LA PROTEÍNA C,  
ASOCIADAS CON UN MAYOR RIESGO TROMBÓTICO

PILAR MEDINA BADENES

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 06  
d'Abril de 2005 davant un tribunal format per:

- D. José Cabo Soler
- D. Enrique Alborch Domínguez
- D. Edelmiro Reganón Salvador
- D. Vicente Vicente García
- D. Ramiro Jover Atienza

Va ser dirigida per:

D. Francisco España Furió

D<sup>a</sup>. Amparo Estellés Cortés

©Copyright: Servei de Publicacions  
Pilar Medina Badenes

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6230-6

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**  
**FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES**  
**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA**  
**I**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**

**DETECCIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN  
COMPONENTES DE LA VÍA DE LA PROTEÍNA C,  
ASOCIADAS CON UN MAYOR RIESGO  
TROMBÓTICO.**

Memoria presentada por  
**Pilar Medina Badenes**  
para optar al grado de  
Doctor en Biología.  
Valencia, 2005.

**D. FRANCISCO ESPAÑA FURIÓ, Doctor en Ciencias Químicas, y Adjunto de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia.**

**CERTIFICA:**

**Que la presente Tesis Doctoral, titulada:**

**“DETECCIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN COMPONENTES DE LA VÍA DE LA PROTEÍNA C, ASOCIADAS CON UN MAYOR RIESGO TROMBÓTICO.”**

**Ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Biología, Dña. PILAR MEDINA BADENES.**

**Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 20 de Enero de dos mil cinco.**

**Fdo: Dr. Francisco España Furió**

**Dña. AMPARO ESTELLÉS CORTÉS, Doctor en Medicina y Cirugía, y Médico Adjunto de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia.**

**CERTIFICA:**

**Que la presente Tesis Doctoral, titulada:**

**“DETECCIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN COMPONENTES DE LA VÍA DE LA PROTEÍNA C, ASOCIADAS CON UN MAYOR RIESGO TROMBÓTICO.”**

**Ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Biología, Dña. PILAR MEDINA BADENES.**

**Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 20 de Enero de dos mil cinco.**

**Fdo: Dra. Amparo Estellés Cortés**

**D. JOSÉ MIGUEL RIVERA OTERO, Doctor en Medicina y Cirugía, y Director del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia.**

**CERTIFICA:**

**Que la presente Tesis Doctoral, titulada:**

**“DETECCIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN COMPONENTES DE LA VÍA DE LA PROTEÍNA C, ASOCIADAS CON UN MAYOR RIESGO TROMBÓTICO.”**

**Ha sido realizada en este Centro de Investigación por la licenciada en Biología, Dña. PILAR MEDINA BADENES.**

**Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 20 de Enero de dos mil cinco.**

**Fdo: Dr. José Miguel Rivera Otero**

**A ti, papá.**





## **AGRADECIMIENTOS**

---

En primer lugar, desearía transmitir mi enorme gratitud al Dr. Francisco España por haber depositado en mí una inmensa confianza; por haberme brindado el reto de iniciar una línea de trabajo sobre el fantástico mundo de la Biología Molecular y las mutaciones, allá en “mis alturas”. Gracias por su incondicional ayuda, sabios consejos y enseñanzas; por su calidad como investigador. Por haberme transmitido y contagiado su nerviosa inquietud científica, así como su capacidad de esfuerzo. Por velar encarecidamente por mi formación en el extranjero y haberme dado la oportunidad de viajar por medio mundo; por incrementar la calidad de mi condición de becaria. En definitiva, por ser el responsable de mi formación como investigadora y por hacer que me encante mi trabajo

También desearía agradecer a la Dra. Amparo Estellés, la codirección de esta tesis. Por sus grandes lecciones y consejos, por conseguir que siempre ampliemos nuestra visión de la homeostasia más allá del pequeño mundo de la APC. Y, especialmente, por su calidad y calidez humana, por su enorme alegría y energía.

Al director del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe, el Dr. José Miguel Rivera el haberme permitido realizar esta tesis doctoral en dicho Centro.

Al Dr. Justo Aznar, Jefe del Departamento de Biopatología Clínica y al Dr. Edelmiro Réganon, Jefe de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación, por haberme prestado su colaboración en cuantas ocasiones ha sido requerida.

Finalmente, no quisiera olvidarme de dar las gracias a todo el personal facultativo de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación, Dra. Virtudes Vila, Dra. Juana Vallés, Dra. M<sup>a</sup> Teresa Santos; y, en general, a todo el personal de la Unidad, por su apoyo y estímulos continuados. Al conjunto de auxiliares que han pasado por aquí durante el transcurso de esta tesis, M<sup>a</sup> Ángeles, Ana, Marisa y Carmen, por hacer nuestra vida mucho más fácil. A Pilar, por su gran apoyo y cariño. Y cómo olvidar a Manuela, Noelia, Emilia, Balvina y Manoli, por traer toda su alegría en sus visitas al laboratorio.

A mis compañeros del Centro, Reme, Silvia, Carmen, Montse, Toni, Marta, Cristina, Luis, Juan, Esther, Gema, Ramiro, Celia, Mónica, Pili, Chelo, Fernando, Raquel y Nati. Por su gran ayuda y solidaridad en momentos difíciles; por todos esos “villancicos precarios” y, especialmente, por los buenos ratos en los congresos.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Desearía agradecer profundamente al Profesor Rogier Bertina, el haberme invitado y acogido en su laboratorio del Centro de Investigación de Trombosis y Hemostasis del Centro Médico Universitario de Leiden (LUMC) en Holanda. Por ofrecerme los mejores medios para realizar un enorme trabajo; por ayudarme a crecer como investigadora y compartir conmigo su enorme sabiduría. Por brindarme su inestimable ayuda en todo momento, tanto científica como personalmente. Y dar las gracias a todos mis compañeros en Leiden, Hans, Cocki, Huib, Marijn, Pernilla, Elaine, Aat, Nico y Marieke, por soportar mi avalancha de preguntas, y por compartir sus conocimientos y experimentos. Por su cariño y amistad, por esas cervecitas, y por sus grandes esfuerzos para “olvidar” el holandés.

También desearía agradecer a mis amigas su gran apoyo, comprensión y ánimo. Por infinidad de momentos increíbles. A las incondicionales... un millón de besos.

A mis hermanos, cuñaditos, a Marta y a Nacho y, como no, a Guiller. Porque, desde mi época en la Facultad, me han animado a llegar más lejos, por compartir y celebrar mis logros y cada momento feliz. Por sus mimos.

Desearía dar un millón de gracias a mis padres, por convertirme en quien soy. Por los numerosos esfuerzos para ofrecerme una gran educación. Por inculcarme su gran responsabilidad, constancia y valores; por enseñarme que los esfuerzos siempre traen su recompensa. Por hacer que mi vida sea genial. Y, en especial, a mi madre por su fuerza, amor, cariño y apoyo en los duros momentos. A todos ellos, por soportar mis grandes ausencias.

Finalmente, quiero dar las gracias a Manolo por su amistad incondicional. Por convertirse en mi paño de lágrimas, por su extraordinaria paciencia y comprensión, por sus sabios consejos. Por su infinito amor.

Esta tesis ha sido financiada por la Dirección General de Enseñanzas Universitarias del Ministerio de Educación y Cultura (PM97-024), por la Fundación Ramón Areces, por el Fondo de Investigación Sanitaria (99/1035) (PI020125) (PI020136), por el Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) e Instituto de Salud Carlos III, por la Generalitat Valenciana-Agencia Valenciana de Ciencia y Tecnología (Grupos03/010) y por la Fundación Mutua Madrileña Automovilista.

## NO TE DETENGAS

No dejes que termine el día sin haber crecido un poco, sin haber sido feliz, sin haber aumentado tus sueños. No te dejes vencer por el desaliento. No permitas que nadie te quite el derecho a expresarte, que es casi un deber. No abandones las ansias de hacer de tu vida algo extraordinario. No dejes de creer que las palabras y las poesías sí pueden cambiar el mundo. Pase lo que pase nuestra esencia está intacta. Somos seres llenos de pasión. La vida es desierto y oasis. Nos derriba, nos lastima, nos enseña, nos convierte en protagonistas de nuestra propia historia. Aunque el viento sople en contra, la poderosa obra continúa: Tú puedes aportar una estrofa. No dejes nunca de soñar, porque en sueños es libre el hombre.

Walt Whitman

## ABREVIATURAS

---

$\alpha_1$ AT	Alfa-1-antitripsina ( <i><math>\alpha_1</math>-proteinase inhibitor</i> )
APC	Proteína C activada
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina de suero bovino
C4b-BP	Proteína de unión al componente del sistema del complemento C4b
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
dITP	2'-desoxiinosina-5'-trifosfato
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
ddNTP	Didesoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Enzimoimmunoensayo
EPCR	Receptor endotelial de la proteína C
FII	Trombina
FT	Factor tisular
FVL	Factor V Leiden
HMWK	Kininógeno de alto peso molecular
IC	Intervalo de confianza
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IL	Interleukina
Kb	Kilobase
LMWH	Heparina de bajo peso molecular
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
mRNA	RNA mensajero
NMDA	N-metil-D-aspartato
OPD	O-fenilendiamina
OR	Odds ratio
PAR	Receptor activado por proteasas
pb	Pares de bases
PC	Proteína C
PCI	Inhibidor de la proteína C
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPACK	D-fenilalanil-L-propil-L-arginina clorometil cetona

## ABREVIATURAS

---

PS	Proteína S
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
sEPCR	Fracción soluble del receptor endotelial de la proteína C
SNP	Polimorfismo en un solo nucleótido
SSCP	Polimorfismo conformacional de cadena sencilla
TAFI	Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina
TBE	Tampón tris-borato
TE	Tampón tris-EDTA
TEV	Tromboembolismo venoso
TFPI	Inhibidor de la vía del factor tisular
TM	Trombomodulina
T <sub>m</sub>	Temperatura de <i>melting</i>
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
TVP	Trombosis venosa profunda
Tween	Polioxietileno-sorbitan-monolaurato

# **ÍNDICE**



<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>59</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>115</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>161</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>195</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>199</b>





<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1 HEMOSTASIA Y COAGULACIÓN</b>	<b>3</b>
1.1.1 MECANISMO DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA	7
1.1.1.1 <u>Vía extrínseca de la coagulación sanguínea</u>	8
1.1.1.2 <u>Vía intrínseca de la coagulación sanguínea</u>	9
1.1.1.3 <u>Conexiones entre ambas vías de la coagulación</u>	10
1.1.2 MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA	11
1.1.2.1 <u>Sistema de inhibidores de las proteasas</u>	13
1.1.2.1.1 Antitrombina	13
1.1.2.1.2 Cofactor II de la heparina	14
1.1.2.1.3 Inhibidor de la vía del factor tisular	15
1.1.2.1.4 Otros inhibidores de proteasas	15
1.1.2.2 <u>Sistema de la proteína C</u>	16
1.1.2.2.1 Propiedades anticoagulantes de la proteína C	17
1.1.2.2.1.1 <i>Activación de la proteína C</i>	18
1.1.2.2.1.2 <i>Función de la proteína C activada</i>	19
1.1.2.2.1.3 <i>Inhibición de la proteína C activada</i>	20
1.1.2.2.1.4 <i>Importancia fisiológica del sistema de la proteína C</i>	21
1.1.2.2.2 Propiedades antiinflamatorias del sistema de la proteína C	22
1.1.2.2.3 Propiedades antiapoptóticas y neuroprotectoras de la proteína C	37
<b>1.2 FACTORES DE RIESGO DE TROMBOSIS RELACIONADOS CON LA VÍA DE LA PROTEÍNA C</b>	<b>40</b>

<b>1.3 DESCRIPCIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEÍNAS QUE FORMAN EL COMPLEJO DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C</b>	<b>42</b>
1.3.1 GEN QUE CODIFICA PARA EL EPCR	42
1.3.1.1 <u>Mutaciones descritas en el gen del EPCR</u>	44
1.3.2 GEN QUE CODIFICA PARA LA TROMBOMODULINA	44
1.3.2.1 <u>Mutaciones descritas en el gen de la trombomodulina</u>	45
1.3.3 GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTROMBINA	47
1.3.3.1 <u>Mutaciones descritas en el gen de la protrombina</u>	49
1.3.4 GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA C	51
1.3.4.1 <u>Mutaciones descritas en el gen de la proteína C</u>	53
<b>2. <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u></b>	<b>55</b>
2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO	57
2.2 OBJETIVOS	58
<b>3. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	<b>59</b>
3.1 GRUPOS CLÍNICOS	61
3.1.1 ESTUDIO DE NIVELES REDUCIDOS DE APC CIRCULANTE COMO FACTOR DE RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA	61
3.1.2 ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL EPCR A LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE EPCR SOLUBLE Y DE APC CIRCULANTE, Y AL RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA	63
3.1.3 GRUPO DE PACIENTES CON NIVELES DE APC REDUCIDOS	63
3.1.4 INDIVIDUOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN FACTOR V LEIDEN	64

<b>3.2 MUESTRAS BIOLÓGICAS</b>	<b>64</b>
3.2.1 MUESTRAS PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA	65
3.2.2 MUESTRAS PARA LAS DETERMINACIONES PROTEICAS	65
3.2.3 MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA C ACTIVADA	65
<b>3.3 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Y ANTICUERPOS</b>	<b>66</b>
<b>3.4 TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS</b>	<b>67</b>
3.4.1 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA C ACTIVADA CIRCULANTE	68
3.4.1.1 <u>Estudio de la influencia del nivel de proteína C o PCI en el ensayo de APC</u>	70
3.4.1.2 <u>Estudio de la influencia de los niveles de <math>\alpha_1</math>AT en el ensayo de APC</u>	71
3.4.1.3 <u>Estudio de la recuperación de APC extrínseca en plasma</u>	71
3.4.1.4 <u>Estudio del bloqueo de la formación de complejos <i>in vitro</i> por el cóctel de inhibidores</u>	71
3.4.2 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA C ANTIGÉNICA	72
3.4.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES FUNCIONALES DE PCI	72
3.4.4 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE $\alpha_1$ AT	73
3.4.5 DETERMINACIÓN DE LOS FRAGMENTOS F1+2 DE LA PROTROMBINA	73
3.4.6 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EPCR SOLUBLE	73
3.4.7 OTRAS DETERMINACIONES	73
<b>3.5 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b>	<b>74</b>
3.5.1 EXTRACCIÓN DE DNA	74
3.5.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	77

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

3.5.2.1	<u>Diseño de cebadores para la amplificación del DNA</u>	79
3.5.2.2	<u>Optimización de las reacciones de PCR</u>	85
3.5.2.3	<u>Amplificación de las muestras por PCR</u>	88
3.5.2.4	<u>Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR</u>	93
3.5.3	SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE PCR	93
3.5.3.1	<u>Purificación de los fragmentos de PCR</u>	96
3.5.3.2	<u>Cuantificación del DNA de las muestras de PCR</u>	97
3.5.3.3	<u>Reacción de secuenciación</u>	98
3.5.3.4	<u>Purificación de los productos de la reacción de secuenciación</u>	99
3.5.3.5	<u>Electroforesis en capilares y lectura de la secuencia</u>	99
3.5.4	POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA	100
3.5.4.1	<u>Tinción de geles de poliacrilamida con plata</u>	102
3.5.4.2	<u>Genotipado del polimorfismo A4600G (Ser219Gly) en el gen del receptor endotelial de la proteína C</u>	102
3.5.4.3	<u>Genotipado del polimorfismo C1418T (Ala455Val) en el gen de la trombomodulina</u>	103
3.5.5	GENOTIPADO DE POLIMORFISMOS POR DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	103
3.5.5.1	<u>Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión enzimática</u>	105
3.5.5.2	<u>Electroforesis en gel de acrilamida de los productos de la digestión enzimática</u>	105
3.5.5.3	<u>Genotipado del polimorfismo G2876A en el gen del EPCR con <i>XspI</i></u>	106
3.5.5.4	<u>Genotipado del polimorfismo T3997C en el gen del EPCR con <i>MboI</i></u>	107
3.5.5.5	<u>Genotipado del polimorfismo G4678C en el gen del EPCR con <i>DdeI</i></u>	107

3.5.5.6	<u>Genotipado del polimorfismo G1456T (Asp468Tyr) en el gen de la trombomodulina con <i>RsaI</i></u>	108
3.5.5.7	<u>Genotipado de la mutación G1435A (Glu16Lys) en el gen de la proteína C con <i>FauI</i></u>	109
3.5.6	GENOTIPADO DE POLIMORFISMOS POR HIBRIDACIÓN CON SONDAS ESPECÍFICAS	110
3.5.6.1	<u>Genotipado de la mutación Factor V Leiden</u>	110
3.5.6.2	<u>Genotipado del polimorfismo G20210A en el gen de la protrombina</u>	110
<b>3.6</b>	<b>ANÁLISIS COMPUTACIONAL</b>	<b>110</b>
3.6.1	ANÁLISIS DE LOS GENES	110
3.6.2	ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS CEBADORES	112
3.6.3	BÚSQUEDA DE DIANAS DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	112
3.6.4	BÚSQUEDA DE DIANAS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	113
3.6.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	113
<b>4.</b>	<b><u>RESULTADOS</u></b>	<b>115</b>
4.1	EVALUACIÓN DEL ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE APC CIRCULANTE	117
4.1.1	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA C EN EL ENSAYO DE APC	117
4.1.2	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE PCI EN EL ENSAYO DE APC	118
4.1.3	ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE $\alpha_1$ AT EN EL ENSAYO DE APC	119
4.1.4	ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN DE APC EXTRÍNSECA AÑADIDA AL PLASMA	120
4.1.5	ESTUDIO DEL BLOQUEO DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS <i>IN VITRO</i> POR EL CÓCTEL DE INHIBIDORES	120

<b>4.2 ESTUDIO DE NIVELES REDUCIDOS DE APC CIRCULANTE COMO FACTOR DE RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA</b>	<b>121</b>
4.2.1 ESTUDIO DE LA VARIACIÓN LONGITUDINAL DEL NIVEL DE APC	124
4.2.2 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA C SOBRE LOS NIVELES DE APC	125
4.2.3 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA GENERACIÓN DE TROMBINA SOBRE LOS NIVELES DE APC	125
4.2.4 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE PCI Y DE $\alpha_1$ AT SOBRE LOS NIVELES DE APC	126
4.2.5 ESTUDIO DE LA HEREDABILIDAD DE NIVELES REDUCIDOS DE APC	126
<b>4.3 BÚSQUEDA DE NUEVAS MUTACIONES EN LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C</b>	<b>128</b>
4.3.1 MUTACIONES EN EL GEN DEL EPCR	128
4.3.1.1 <u>Nuevas mutaciones encontradas en el gen del EPCR</u>	128
4.3.1.2 <u>Caracterización de las mutaciones encontradas</u>	130
4.3.1.2.1 Análisis de la mutación G2876A en el gen del EPCR	130
4.3.1.2.2 Análisis de la mutación T3997C en el gen del EPCR	131
4.3.1.2.3 Análisis de la mutación A4600G (Ser219Gly) en el gen del EPCR	133
4.3.1.2.4 Análisis de la mutación G4678C en el gen del EPCR	134
4.3.1.3 <u>Análisis de la asociación de las mutaciones en el gen del EPCR con el riesgo de trombosis</u>	136
4.3.2 MUTACIONES EN EL GEN DE LA TROMBOMODULINA	137
4.3.2.1 <u>Nuevas mutaciones encontradas en el gen de la trombomodulina</u>	137

4.3.2.2	<u>Caracterización de las mutaciones descritas</u>	138
4.3.2.2.1	Análisis de la mutación C1418T (Ala455Val) en el gen de la trombomodulina	138
4.3.2.2.2	Análisis de la mutación G1456T (Asp468Tyr) en el gen de la trombomodulina	140
4.3.2.3	<u>Análisis de la asociación de las mutaciones en el gen de la trombomodulina con el riesgo de trombosis</u>	141
4.3.3	MUTACIONES EN EL GEN DE LA PROTROMBINA	143
4.3.3.1	<u>Nuevas mutaciones encontradas en el gen de la protrombina</u>	143
4.3.3.2	<u>Caracterización de las mutaciones encontradas</u>	145
4.3.3.3	<u>Análisis de la asociación de las mutaciones en el gen de la protrombina con el riesgo de trombosis</u>	145
4.3.4	MUTACIONES EN EL GEN DE LA PROTEÍNA C	147
4.3.4.1	<u>Nuevas mutaciones encontradas en el gen de la proteína C</u>	147
4.3.4.2	<u>Caracterización de las mutaciones encontradas</u>	148
4.3.4.2.1	Análisis de la mutación G1435A (Glu16Lys) en el gen de la proteína C	149
4.3.4.3	<u>Análisis de la asociación de las mutaciones en el gen de la proteína C con el riesgo de trombosis</u>	150
4.4	<b>ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL EPCR A LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE EPCR SOLUBLE Y DE APC CIRCULANTE, Y AL RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA</b>	151
4.5	<b>ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL EPCR AL RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA EN INDIVIDUOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN FACTOR V LEIDEN</b>	156



<b>5. <u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>161</b>
5.1 ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE APC CIRCULANTE	163
5.2 ESTUDIO DE NIVELES REDUCIDOS DE APC CIRCULANTE COMO FACTOR DE RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA	165
5.3 BÚSQUEDA DE NUEVAS MUTACIONES EN LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C	169
5.3.1 MUTACIONES EN EL GEN DEL EPCR	170
5.3.2 MUTACIONES EN EL GEN DE LA TROMBOMODULINA	174
5.3.3 MUTACIONES EN EL GEN DE LA PROTROMBINA	176
5.3.4 MUTACIONES EN EL GEN DE LA PROTEÍNA C	179
5.4 ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL EPCR A LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE EPCR SOLUBLE Y DE APC CIRCULANTE, Y AL RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA	186
5.5 ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL EPCR AL RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA EN INDIVIDUOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN FACTOR V LEIDEN	191
<b>6. <u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>195</b>
<b>7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>199</b>

# **1. INTRODUCCIÓN**

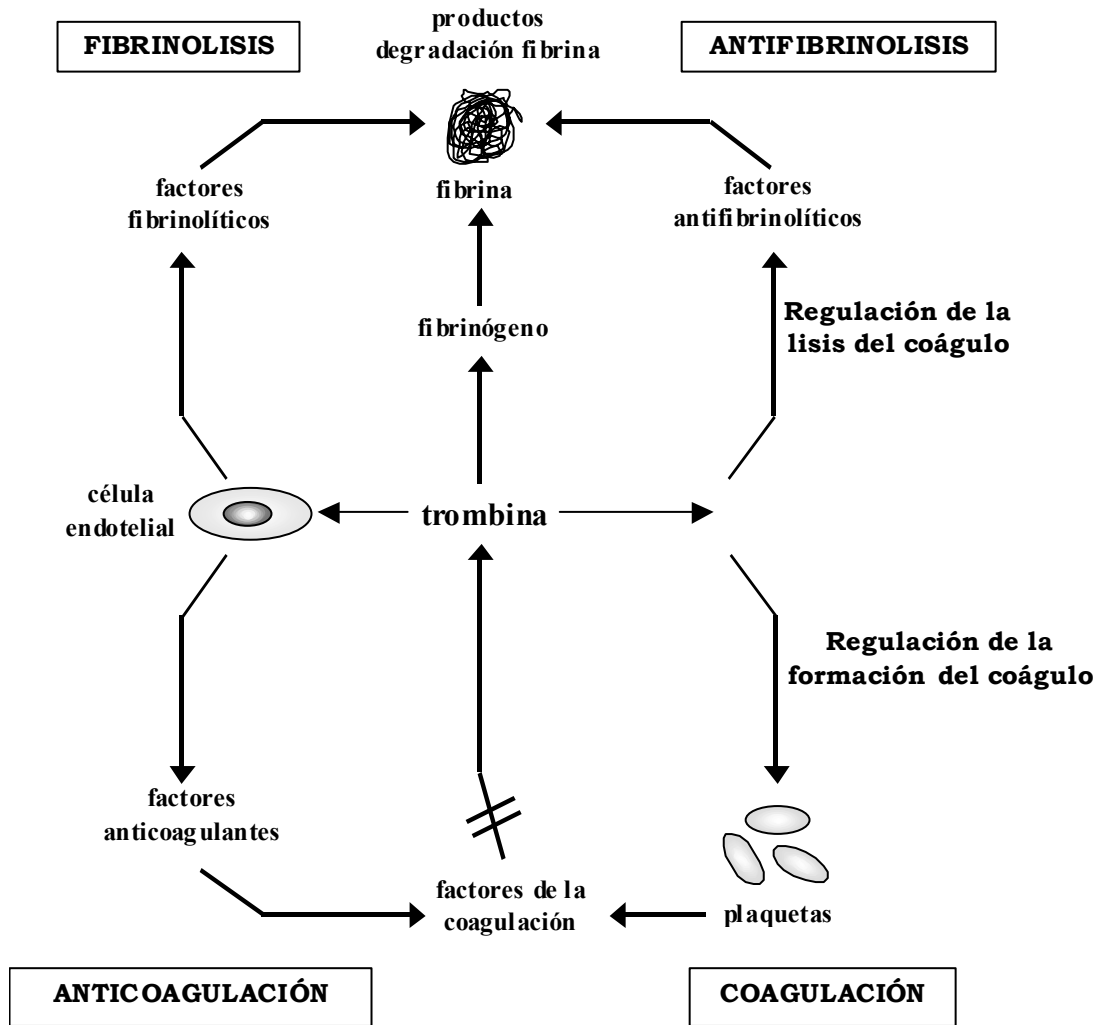


## **1.1 HEMOSTASIA Y COAGULACIÓN**

La hemostasia es el conjunto de procesos que controlan la fluidez de la sangre y la integridad del sistema vascular. El sistema hemostático contribuye a una variedad de sistemas de defensa del organismo que son esenciales para la vida. Por una parte, impide tanto la pérdida de sangre como las alteraciones del flujo sanguíneo, pero también contribuye a la reparación del daño tisular y vascular. Además, participa en la formación del nuevo tejido conectivo y en la revascularización. La hemostasia comprende un elevado número de reacciones e interacciones complejas entre los componentes sanguíneos y la pared de los vasos, como queda reflejado en la *Figura 1.1*.

Cuando un vaso sanguíneo se rompe o daña, se ponen en marcha los mecanismos hemostáticos que, a efectos didácticos, podemos agrupar en cuatro fases: la primera es la contracción de la pared del vaso; la segunda es la adhesión de las plaquetas a la zona de la pared dañada y agregación de las plaquetas entre sí; la tercera es la formación y consolidación del coágulo de fibrina y, por último, la cuarta fase es la eliminación del coágulo. Las dos primeras forman la llamada **hemostasia primaria** y, las otras dos, la **hemostasia secundaria**. Todos estos mecanismos son esenciales para una hemostasia normal, y están perfectamente sincronizados y relacionados entre sí. Cuando esta sincronía se rompe a favor de la coagulación se produce una trombosis, mientras que si se desequilibra en el sentido de disminuir la velocidad de formación del coágulo puede producirse una hemorragia.

La hemostasia primaria es el conjunto de mecanismos que generan el primer tapón hemostático instantáneo en el vaso dañado, formado por una combinación de vasoconstricción y adhesión y agregación de las plaquetas. Los componentes principales de la hemostasia primaria son los vasos sanguíneos y las plaquetas, además de otros componentes plasmáticos. La pared del vaso sanguíneo contiene tres partes bien diferenciadas, la íntima, la capa media y la adventicia. La íntima es la capa más interna, y está formada por una monocapa de células endoteliales (endotelio vascular) que están en contacto con la sangre circulante, y que juegan un papel fundamental en la hemostasia. El endotelio vascular sintetiza y libera multitud de sustancias importantes para la hemostasia, unas con actividad protrombótica y otras antitrombóticas (1, 2).



**Figura 1.1 Sistema hemostático.** El sistema hemostático se podría dividir en cuatro partes. La coagulación y la anticoagulación controlan la formación del coágulo, mientras que la fibrinólisis y la antifibrinólisis controlan la eliminación del coágulo. Todas ellas están coordinadas por la trombina. La trombina modifica las plaquetas para acelerar la coagulación y liberar el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1). A su vez, la trombina actúa sobre las células endoteliales induciendo la liberación del activador del plasminógeno. La trombina convierte al fibrinógeno en fibrina, la cual se polimeriza para formar el coágulo. Y la trombina activa al factor XIII, el cual estabiliza a la fibrina, haciéndola resistente a su disolución. Así, la respuesta del sistema hemostático (formación y disolución del coágulo) es dependiente de la concentración de trombina y de la normalidad de las cuatro dianas sobre las que actúa la trombina (plaquetas, células endoteliales, fibrinógeno y factor XIII). Si las plaquetas son anormales, pueden no responder a la trombina y la coagulación se retrasa, dando lugar a hemorragias. Si las células endoteliales son anormales, pueden no responder a la trombina y facilitar la trombosis.

La presencia de un endotelio intacto en todo el sistema circulatorio evita que se formen coágulos sanguíneos en el interior de los vasos debido a un balance favorable hacia la acción antitrombótica (3). Así, la prostaciclina producida por el endotelio tiene una potente acción vasodilatadora e inhibidora de la adhesión y agregación plaquetar.

La trombomodulina es un receptor endotelial para la trombina que transforma este enzima procoagulante en un enzima anticoagulante una vez formado el complejo trombina-trombomodulina. Este complejo activa al zimógeno proteína C formándose la proteína C activada (APC) un potente anticoagulante que actúa junto a la proteína S inhibiendo a los cofactores de la coagulación activados Va y VIIIa. El receptor endotelial de la proteína C (EPCR) estimula la activación de la proteína C por el complejo trombina-trombomodulina. Además, los activadores del plasminógeno liberados por el endotelio activan al plasminógeno, generando plasmina, que disuelve los coágulos de fibrina. Por último, los glicosaminoglicanos de la pared vascular potencian la acción anticoagulante de la antitrombina.

Cuando se produce la rotura de un vaso, la sangre se extravasa y el organismo debe responder para evitar la pérdida de sangre, iniciándose el mecanismo de la hemostasia primaria. Sin embargo, el tapón plaquetar por sí solo no tiene la consistencia suficiente para detener la hemorragia, y sólo es capaz de retrasarla unos cuantos segundos. Debe iniciarse el mecanismo de la hemostasia secundaria para formar el coágulo de fibrina más estable y consistente. La hemostasia secundaria está formada por dos sistemas, la coagulación sanguínea y la fibrinólisis, los cuales están controlados por la anticoagulación y la antifibrinólisis, respectivamente.

El sistema de la coagulación lo forman diversas proteínas, casi todas enzimas, que circulan como proenzimas inactivos, y que se activan unas a otras secuencialmente formando una cascada de reacciones enzimáticas. Estas reacciones enzimáticas tienen lugar sobre una superficie fosfolipídica, bien sobre las plaquetas activadas bien sobre la membrana de la célula endotelial activada de la pared del vaso, y requieren la presencia de cofactores no enzimáticos (4, 5).

En esta cascada de activación, el enzima es un factor de la coagulación activado mientras que el sustrato, en la mayoría de los casos unido a una superficie, es un precursor inactivo de otro factor de la coagulación que se activa tras la rotura y separación de una pequeña parte de su molécula, el péptido de activación. Sin embargo, en ocasiones se requiere más de una rotura y no siempre se libera dicho péptido, que puede quedar unido a la molécula enzimática por puentes disulfuro o por enlaces no covalentes. La rotura del péptido de activación generalmente produce un importante cambio conformacional que expone el sitio activo del enzima, el cual quedaba oculto en la forma de proenzima.

Algunos de estos factores son vitamina K dependientes, caracterizados por la presencia en su molécula de una región N-terminal rica en ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (dominio Gla) (6). La proteína se sintetiza con estos residuos en la forma de ácido glutámico (Glu), y debe sufrir un procesamiento post-traducciona l de carboxilación para

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

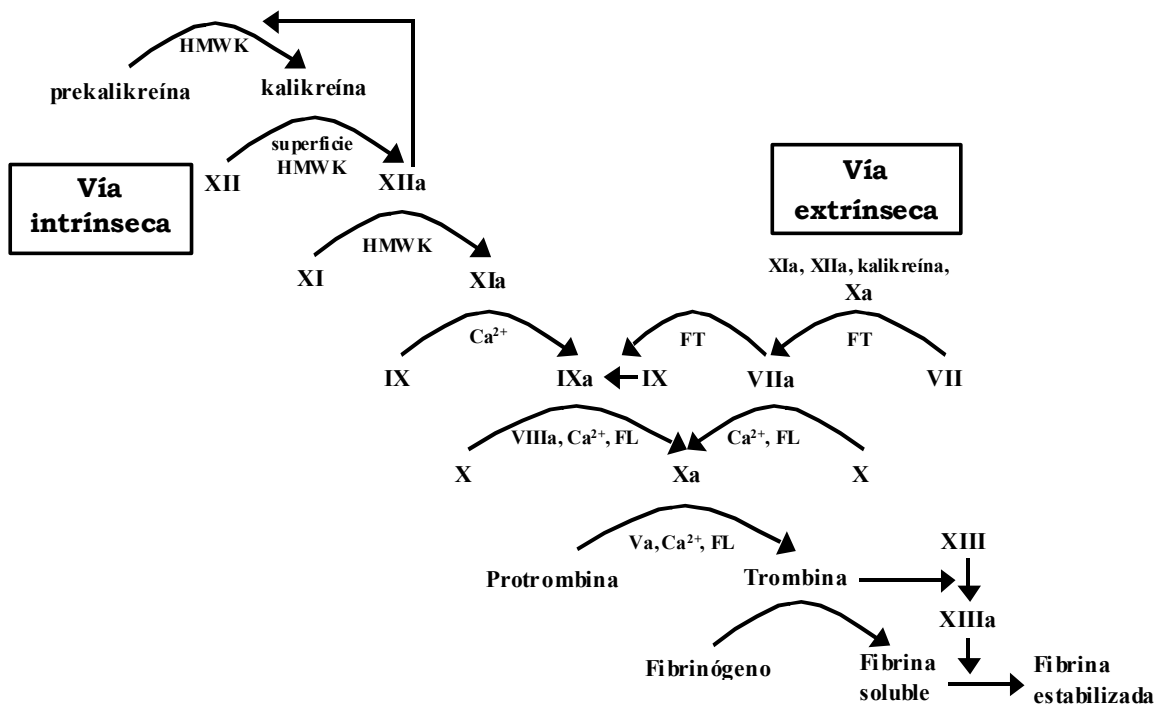
la conversión de dichos residuos en  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla) (7). Estos residuos Gla son necesarios para la unión a las superficies fosfolipídicas negativas, a través de iones calcio que actúan de puentes de unión y que son cofactores esenciales en la mayoría de reacciones de la cascada de la coagulación (8). La carboxilación de los residuos de ácido glutámico la lleva a cabo el enzima  $\gamma$ -glutamylcarboxilasa. La vitamina K es un cofactor necesario en esta reacción, en la forma de vitamina K reducida. Durante la reacción de carboxilación se genera una forma inactiva, la vitamina K epóxido, la cual debe regenerarse para poder seguir actuando. El enzima vitamina K epoxi reductasa es el que regenera de nuevo la vitamina K, la cual se reduce por acción de la vitamina K reductasa. Los antagonistas de la vitamina K, warfarina y acenocumarol, son drogas que actúan como anticoagulantes orales al inhibir la  $\gamma$ -carboxilación, impidiendo la regeneración de vitamina K a dos niveles, lo cual conduce a la formación de factores de la coagulación parcialmente o totalmente inactivos (7).

Otros componentes de la coagulación actúan como cofactores necesarios para la función de los enzimas que intervienen en la coagulación. Estos cofactores son principalmente proteínas, pero también otros tipos de compuestos, que generalmente actúan situando a los enzimas y sustratos en una posición óptima para su interacción, bien entre ellos o con las superficies que soportan dichas reacciones. Como ejemplo podemos citar al factor tisular (FT) y a los cofactores VIIIa y Va. Estos cofactores localizan a los correspondientes enzimas (VIIa, IXa y Xa, respectivamente) y sustratos (X y IX, X, y II, respectivamente) sobre la superficie fosfolipídica a la cual se unen por los residuos Gla a través de puentes de iones calcio. El absoluto requerimiento de la superficie para que tengan lugar las reacciones de coagulación es una de las formas de control de la coagulación, puesto que dichas superficies fosfolipídicas cargadas negativamente no están disponibles habitualmente, y únicamente aparecen al activarse las plaquetas o el endotelio. Además, ayuda a focalizar la formación del coágulo sanguíneo en las zonas donde está la lesión vascular, evitando su propagación sistémica.

La coagulación sanguínea es un proceso que ocurre de forma continuada, aunque generalmente a muy baja velocidad, controlada por el exceso de inhibidores circulantes (9). Una prueba de ello es la presencia, en condiciones basales, de trazas de prácticamente todos los factores de coagulación activados en la circulación, así como de los péptidos de activación y de los complejos formados entre los enzimas y sus correspondientes inhibidores. Cuando se activa la coagulación, todos estos marcadores se elevan considerablemente.

### 1.1.1 MECANISMO DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA

La coagulación sanguínea se lleva a cabo a través de una serie de activaciones de zimógenos que culminan en la generación de trombina y en la consiguiente formación del coágulo de fibrina. Como puede observarse en la *Figura 1.2*, existen dos vías para iniciar la coagulación sanguínea, la **vía extrínseca** y la **vía intrínseca** (10).



*Figura 1.2.* Esquema de la coagulación sanguínea.

En la vía extrínseca, la cascada de la coagulación se inicia por exposición del FT al torrente circulatorio. Esto ocurre fundamentalmente tras la rotura de un vaso, pero también puede iniciarse por activación plaquetar o por activación de monocitos. El FT actúa como cofactor del factor VIIa presente en la circulación, y el complejo factor VIIa-FT activa al factor X. Por el contrario, la vía intrínseca de la coagulación se inicia, generalmente, tras la exposición de la sangre a superficies extrañas cargadas negativamente. Aquí es el factor XII el que se une a dichas superficies, experimentando un proceso de autoactivación e iniciando la cascada de la coagulación. Ambas vías convergen en la activación del factor X, dando lugar a una vía final común. Las dos vías pueden ser activadas *in vivo* por diferentes mecanismos, tales como la acción de ciertas proteasas bacterianas, proteasas derivadas de tumores, enzimas de veneno de serpiente, etc. Estas dos vías de iniciación de la coagulación no están realmente separadas, sino que interactúan muy activamente entre sí de forma constante y continua (11).



### 1.1.1.1 Vía extrínseca de la coagulación sanguínea

La activación fisiológica de la coagulación sanguínea transcurre principalmente por la vía extrínseca. En ella, el FT juega un papel fundamental como iniciador del sistema de coagulación (12). El FT es una proteína de membrana que está presente en la superficie de determinados tipos celulares tales como células del subendotelio, plaquetas y monocitos, pero no expuesto a la sangre circulante (13). El FT puede ser expuesto en superficie tras la rotura de un vaso o tras la estimulación celular, como ocurre durante la inflamación o por acción de las endotoxinas en la sepsis. Además, el FT también puede ser expresado de *novo* tras la inducción por parte de la interleukina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), la trombina y otros inductores (14). Se desconoce con exactitud qué ocurre tras la interacción del factor VII con el FT. Posiblemente el contacto de ambas proteínas conduce a la formación de trazas de factor VIIa, formándose un complejo ternario FT-VIIa-X que activa al factor X en presencia de fosfolípidos y de iones calcio. Otra posibilidad sería que siempre existan trazas de factor VIIa en la circulación que normalmente no puedan iniciar la coagulación por la ausencia de suficiente FT y de una superficie adecuada. De hecho, en condiciones basales existe entre 0,1 y 1% de factor VIIa circulante. Este factor VIIa parece ser generado por el factor IXa, puesto que los pacientes con hemofilia B tienen niveles de factor VIIa 10 veces menores que la población sana. La actividad del factor VIIa circulante es muy débil, pero cuando se une al FT esta actividad aumenta más de un millón de veces, iniciándose la activación del factor X. A continuación, el factor Xa activa al factor II para producir el enzima trombina. En esta etapa, debe formarse de nuevo un complejo ternario entre el enzima, el factor Xa, el sustrato factor II y el cofactor, factor Va, sobre una superficie fosfolípídica adecuada, a través de puentes de iones calcio. La trombina, a su vez, convierte al fibrinógeno en fibrina, que polimeriza a fibrina insoluble por acción del factor XIIIa.

El fibrinógeno es una proteína compuesta por tres cadenas dobles denominadas A $\alpha$ , B $\beta$  y  $\gamma$ , conectadas entre sí por numerosos puentes disulfuro (15). La molécula tiene la forma de un puro con un nódulo central, el dominio E, y dos nódulos laterales denominados dominios D. La trombina actúa sobre el fibrinógeno separando dos péptidos del dominio central E, denominados fibrinopéptidos A y B, formándose los monómeros de fibrina (o des-AB-fibrina), que se unen por enlaces electrostáticos dando lugar a la llamada fibrina soluble. Simultáneamente, el factor XIII que circula unido al fibrinógeno, se activa en esta etapa de la coagulación. El factor XIIIa es una transglutaminasa que une entre sí a las moléculas de fibrina, estabilizando de esta manera el coágulo inicialmente soluble. Además, el factor XIIIa también es capaz de inducir la unión de la fibrina a otras moléculas como la  $\alpha_2$ -antiplasmina y el inhibidor de

la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), lo cual previene una disolución demasiado rápida del coágulo de fibrina. Parte de la fibrina también permanece unida al coágulo de forma activa. Además, esta trombina es difícil de inactivar por el complejo antitrombina-heparina, pero es inhibida relativamente rápido por inhibidores de bajo peso molecular como la hirudina o derivados de benzamidina.

La fibrina forma una malla tridimensional, y contiene atrapados diversos tipos de células tales como eritrocitos, monocitos y plaquetas. Este coágulo es estable por algún tiempo, hasta que el proceso fibrinolítico comienza a actuar con eficacia. Sin embargo, como el coágulo contiene trombina activa, es posible que algunas partes del mismo, durante su disolución, puedan llevar sustancias trombogénicas potencialmente peligrosas a otros lugares del torrente circulatorio, dando lugar a un proceso tromboembólico como la embolia pulmonar o la embolia cerebral.

### **1.1.1.2 Vía intrínseca de la coagulación sanguínea**

La segunda vía de activación de la coagulación es la denominada vía intrínseca, la cual se inicia tras la activación del factor XII. *In vivo*, esta activación tiene lugar por exposición del proenzima a superficies cargadas negativamente, tales como la membrana basal de la pared del vaso, cristales de ácido úrico o plaquetas activadas. *In vitro*, superficies como vidrio o caolín, rápidamente promueven la activación del factor XII e inician la coagulación sanguínea. El factor XIIa activa a la prekalikreína a kalikreína la cual es, a su vez, un potente activador del factor XII, formándose mediante este mecanismo de retroalimentación positivo, cantidades apreciables de factor XIIa. En la misma superficie, este factor XIIa activa al factor XI, generando factor XIa. Para ello se requiere un cofactor no enzimático, el kininógeno de alto peso molecular (HMWK), el cual circula en plasma formando un complejo con el factor XI, por un lado, y con la prekalikreína por otro. El papel de este cofactor es llevar a los proenzimas factor XI y prekalikreína, a las proximidades del factor XIIa, ya que el HMWK se une fuertemente a las superficies negativas, al igual que el factor XII. Estas reacciones no requieren la presencia de iones calcio.

El factor XIa, a su vez, activa al factor IX para dar IXa. Esta reacción tiene lugar sobre la misma superficie, y requiere la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . El factor IXa junto con su cofactor activado, el factor VIIIa, y  $\text{Ca}^{2+}$ , activa al factor X para dar Xa. El resto de reacciones son comunes para las dos vías.

### 1.1.1.3

### Conexiones entre ambas vías de la coagulación

El sistema de la coagulación sanguínea es, en realidad, mucho más complejo puesto que existen interconexiones entre las dos vías de la coagulación descritas, así como diversos mecanismos de retroalimentación positivos y negativos que controlan la velocidad y extensión de la activación de la coagulación (16).

Una vez aceptado que la principal, si no única, vía de iniciación de la coagulación *in vivo* era la extrínseca, debía explicarse el motivo por el que las deficiencias de los factores VIII y IX, componentes de la vía intrínseca, causan hemorragias graves, y que una deficiencia de factor XI provocara también complicaciones hemorrágicas, lo cual sugería que estos factores eran importantes en la coagulación *in vivo*. En los últimos años se ha logrado encontrar una explicación a esta aparente paradoja, dando lugar a la revisión del concepto clásico de coagulación. El hallazgo principal fue que el factor VIIa activa preferentemente al factor IX en presencia de bajas concentraciones de FT. Por lo tanto, en los inicios de la coagulación y antes de la explosión de la misma, las pequeñas cantidades de FT se unen al factor VIIa y al factor IX en la superficie fosfolípídica, generando factor IXa el cual, en presencia de factor VIIIa, activa al factor X. De esta forma, se consigue rápidamente una elevada concentración de factor Xa, el cual puede activar rápidamente más factor VII en presencia de FT, continuando ya la clásica vía extrínseca. Sin embargo, en ausencia de factor IX o de su cofactor el factor VIII, la generación de factor VIIa y Xa resulta drásticamente reducida, explicando la hemofilia asociada a sus deficiencias. En cuanto al requerimiento del factor XI, se ha visto que éste es activado por la trombina a concentraciones relativamente altas. Por lo tanto, este mecanismo reforzaría todavía más la producción de factor IXa y, a su vez, de factor VIIa y Xa.

La trombina constituye un importante mecanismo de retroalimentación positivo, puesto que ejerce un papel central en el control de la coagulación. Así, además de generar la fibrina, activa a los cofactores de la coagulación V y VIII, esenciales para las etapas de activación de los factores II y X, respectivamente. Así, por ejemplo, la incorporación del factor Va en el complejo formado por fosfolípidos,  $Ca^{2+}$ , factor Xa y factor II aumenta ~13.000 veces la velocidad de formación de trombina, mientras que el factor V posee el 0,27% de la actividad procoagulante del factor Va activado por la trombina (17). Un hecho similar ocurre con el cofactor VIII en la activación del factor X por el complejo fosfolípidos- $Ca^{2+}$ -factor IXa.

### 1.1.2 MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA

La propia naturaleza de la coagulación sanguínea exige mecanismos de regulación que eviten su propagación y extensión de un modo incontrolado. De hecho, la trombosis es la principal causa de mortalidad y morbilidad en países desarrollados, puesto que puede dar lugar a infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y trombosis venosa (18). Por ello, resulta de gran interés conocer los mecanismos que regulan la formación del trombo. El requerimiento de una superficie adecuada limita ya, considerablemente, su propagación más allá del lugar del daño vascular, al restringir las reacciones enzimáticas en dicho lugar. Otro mecanismo de control es la fibrinólisis, que actúa desde un primer momento limitando el crecimiento del trombo. Sin embargo, existe un control directo que limita la actividad de los enzimas de la coagulación, denominado **mecanismo de la anticoagulación**. El mecanismo de anticoagulación está formado por dos sistemas inhibitorios complementarios: el **sistema de inhibidores de proteasas** y el **sistema de la proteína C**, cuyos principales componentes se muestran en la *Tabla 1.1*.

Además, existen otras proteínas que se unen a los fosfolípidos y que parecen ser capaces de regular la coagulación. Un ejemplo es la anexina V, que se une a superficies procoagulantes y las neutraliza eliminando el soporte natural donde tienen lugar las reacciones de coagulación. Sin embargo, se desconoce la importancia fisiológica de esta función.

La antitrombina, el cofactor II de la heparina (HC II), la  $\alpha_1$ -antitripsina ( $\alpha_1$ AT), el C1-Inhibidor y el inhibidor de la proteína C activada (PCI) pertenecen al grupo de las serpinas (*serin protease inhibitor*), caracterizadas por inhibir a los enzimas tipo serina, y cuyos componentes tienen una alta homología estructural y un mecanismo de acción similar (19). Estos inhibidores actúan en realidad como falsos sustratos de los enzimas a los que inhiben (20). Tras la unión al enzima, se forma un complejo de transición. Al contrario de las típicas reacciones enzimáticas en las que el enzima ataca rápidamente al sustrato, lo transforma en producto y se libera para actuar sobre otra molécula de sustrato, la unión del enzima a la serpina produce, en primer lugar, un complejo inestable. A continuación, el enzima escinde un enlace peptídico en la molécula del inhibidor, produciéndose un complejo intermedio que, según las condiciones de la reacción, puede desembocar en la formación de un complejo covalente estable entre el enzima y el sustrato quedando bloqueado el centro activo del enzima, o puede disociarse dando lugar al inhibidor inactivado y al enzima activo. Por tanto, en este tipo de reacciones por cada mol de inhibidor únicamente se inhibe un máximo de un mol de

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C \_\_\_\_\_

enzima, mientras que en las típicas reacciones enzimáticas un mol de enzima es capaz de catalizar la transformación de miles de moles de sustrato.

*Tabla 1.1. Componentes de los sistemas anticoagulantes.*

COMPONENTE	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	GEN (Kb)	PESO MOLECULAR	VIDA MEDIA (días)	CONCENTR. PLASMÁTICA (µg/ml)	ESPECIFICIDAD
<b>INHIBIDORES DE PROTEASAS</b>						
<b>Antitrombina</b>	1q23-q25	14	58.000	2 – 3	220	IIa, Xa, IXa
<b>Cofactor II de la heparina</b>	22q11.21	16	66.000	2,5	90	IIa
<b>TFPI<sup>1</sup></b>	2q31-q32.1	85	57.000	2,5	1	Xa, VIIa-FT
<b>α<sub>2</sub>-macroglobulina</b>	12p13.3-p12.3	48	725.000	2 – 3	2.500	Inespecífico
<b>α<sub>1</sub>-antitripsina</b>	14q32.1	12,2	55.000	1 – 2	3.000	XIa, APC
<b>C1-Inhibidor</b>	11q12-q13.1	6	65.000	3 – 4	200	XIIa, XIa, KK
<b>SISTEMA DE LA PROTEÍNA C</b>						
<b>Proteína C</b>	2q13-q14	11,2	62.000	0,25	4	Va, VIIIa
<b>Proteína S</b>	3q11.2	80	69.000	1,75	35	Cofactor APC
<b>Trombomodulina</b>	20p12-cen	3,7	60.300	-	-	Cofactores activación proteína C
<b>EPCR<sup>2</sup></b>	20q11.2	6	49.000	-	-	
<b>PCI<sup>3</sup></b>	14q32.1	11,5	57.000	1	5	APC
<b>C4b-BP<sup>4</sup></b>	1q32	40	570.000	-	-	Proteína S

<sup>1</sup> TFPI, inhibidor de la vía del factor tisular; <sup>2</sup> EPCR, receptor endotelial de la proteína C; <sup>3</sup> PCI, inhibidor de la proteína C activada; <sup>4</sup> C4b-BP, proteína de unión al componente del sistema del complemento C4b.

La molécula del enzima en el complejo enzima-serpina mantiene intacto su centro activo, pero no está disponible al estar enmascarado por la molécula del

inhibidor. Sin embargo, cuando por procedimientos químicos disociamos dicho complejo, el enzima liberado retiene completamente su actividad, mientras que el inhibidor está inactivado y no retiene ya su actividad inhibitoria. La eficiencia de la inhibición del enzima por la serpina es relativamente baja, siendo por lo general mucho menor de mol:mol. Sin embargo, algunos cofactores pueden acelerar y favorecer la formación de complejos estables enzima:inhibidor. Tal es el caso de la heparina, que es capaz de estimular a algunas de las serpinas para favorecer la vía de formación de complejos estables aumentando, por tanto, la eficiencia del inhibidor al tiempo que acelera dicha reacción.

El resto de inhibidores de la coagulación:  $\alpha_2$ -macroglobulina, el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) y el sistema de la proteína C, actúan mediante otros mecanismos distintos al de estos inhibidores tipo serpina.

### **1.1.2.1 Sistema de inhibidores de las proteasas**

#### **1.1.2.1.1 Antitrombina**

Junto con el sistema de la proteína C, es el principal regulador de la generación de trombina. La antitrombina es capaz de inhibir a la mayor parte de los factores de la coagulación activados, como el factor XIIa, factor XIa, kalikreína, factor IXa, factor Xa y trombina, aunque actúa preferentemente sobre los factores IIa, Xa y IXa (21). *In vitro*, la inhibición de estas enzimas por la antitrombina es lenta (22). Sin embargo, *in vivo* su actividad resulta fuertemente potenciada por los glicosaminoglicanos presentes en la superficie endotelial, al igual que por la heparina normal y fraccionada utilizada durante la terapia anticoagulante (23-25). Para que las heparinas ejerzan una función adecuada, se requiere una concentración de antitrombina por encima del 40 – 50%. Puesto que tanto la heparina no fraccionada como la heparina de bajo peso molecular (LMWH) son ampliamente utilizadas en la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad tromboembólica, parece conveniente describir el diferente modo de acción de cada una de ellas.

La antitrombina es activada mediante la unión de un pentasacárido presente en estas moléculas (26, 27) que induce un cambio conformacional en la antitrombina exponiendo su centro activo. La longitud de la molécula de heparina es determinante en la inactivación del factor Xa y de la trombina por la antitrombina, puesto que la heparina también debe interactuar con la trombina. Mientras que la longitud de la cadena de heparina necesaria para la inactivación del factor Xa es pequeña, para la

inactivación de la trombina se requieren moléculas de heparina más largas capaces de unirse a la región *exosite II* de la trombina y facilitar la formación del complejo trombina-antitrombina. Esto explica que, mientras que la heparina no fraccionada (con un peso molecular promedio de 18.000) posee similar actividad frente al factor Xa y la trombina, la LMWH puede catalizar eficientemente la inhibición del factor Xa pero no es lo suficientemente larga como para interactuar con la molécula de trombina y potenciar su inhibición de manera efectiva (28).

La deficiencia heterocigota de antitrombina incrementa unas 5 veces el riesgo de trombosis venosa (29), y se encuentra en el 0,05% – 1% de individuos sanos (30), en el 1% de los pacientes consecutivos con un primer episodio trombótico (29), y en el 4% de las familias con trombofilia hereditaria (11, 31). Los estudios familiares sugieren que la deficiencia de antitrombina confiere un mayor riesgo de trombosis que la deficiencia de proteína C o de proteína S, y la mayoría de pacientes sufren el episodio trombótico antes de los 25 años (32, 33). Se ha descrito la existencia de mutaciones en la molécula de antitrombina que originan un cambio conformacional por la formación de oligómeros de la proteína mutada impidiendo su correcta secreción, lo que da lugar a una deficiencia de antitrombina y a episodios trombóticos severos y a una edad temprana (34). No se han identificado deficiencias homocigotas de antitrombina, lo que indica la importancia del papel que ejerce la antitrombina en la regulación de la generación de trombina.

### **1.1.2.1.2**

### **Cofactor II de la heparina**

El HC II es un inhibidor homólogo a la antitrombina, pero con diferente especificidad (35). Requiere concentraciones de heparina más elevadas para su actividad, e inhibe a la trombina pero no al factor Xa ni al IXa. El dermatán sulfato, otro glicosaminoglicano, también acelera la inactivación de la trombina por el HC II, mientras que no tiene efecto sobre la antitrombina.

Aunque se han descrito deficiencias de HC II asociadas a trombosis, no se ha establecido claramente su relevancia clínica ni los mecanismos moleculares que la originan, ya que en una familia con deficiencia de HC II en la que dos de sus miembros eran homocigotos, no se pudo establecer una clara asociación entre la deficiencia homocigota de HC II y un fenotipo clínico (36, 37).

### **1.1.2.1.3**

#### **Inhibidor de la vía del factor tisular**

El TFPI, también conocido como inhibidor de la vía extrínseca (EPI) o como inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteína (LACI), inhibe al factor Xa y al complejo VIIa-FT, pero no al factor VIIa libre, a través de un mecanismo de acción completamente diferente al de los demás inhibidores de la coagulación (38, 39) El TFPI posee dos centros activos, lo que permite a su molécula unirse a dos enzimas simultáneamente. El mecanismo de inhibición del factor VIIa por el TFPI es algo complicado. Parece ser que el TFPI debe unirse primero al factor Xa para poder inhibir al factor VIIa que se encuentra unido al FT. De esta manera se evita que el TFPI intervenga en las primeras etapas de la coagulación, permitiendo la generación de una cierta cantidad de factor VIIa. El papel del factor Xa en esta reacción no está muy claro pero parece que, al unirse al TFPI, induce un cambio conformacional en el segundo centro activo que le permite reaccionar con el complejo VIIa-FT.

El TFPI se encuentra en la circulación en tres formas moleculares diferentes. La mayor parte se encuentra asociado a lipoproteínas como el LDL y VLDL, mientras que otra parte circula en forma libre. Parte del TFPI se encuentra unido al endotelio vascular a través de glicosaminoglicanos, lo cual puede explicar el aumento en la concentración de TFPI durante la administración de heparina o LMWH, lo que a su vez contribuye al efecto anticoagulante de estas sustancias. Y, además, la heparina tiene la capacidad de estimular la actividad del TFPI.

A pesar de la fuerte evidencia experimental del papel del TFPI en la regulación de la coagulación, no existe una clara asociación entre los niveles de TFPI en plasma y el riesgo de trombosis (40). Sin embargo, en un reciente estudio se ha observado que niveles de TFPI reducidos, especialmente los niveles de TFPI libre y antigénico total en plasma, constituyen un factor de riesgo débil de trombosis venosa profunda (TVP) (41). Por otro lado, se ha descrito la existencia de una familia con historia de trombofilia en la que dos de sus tres miembros presentaban una deficiencia parcial de TFPI (42).

### **1.1.2.1.4**

#### **Otros inhibidores de proteasas**

El plasma contiene otros muchos inhibidores, algunos de los cuales participan en la inhibición de los enzimas de la coagulación, si bien su especificidad no es muy elevada.

La  $\alpha_2$ -macroglobulina es un inhibidor de reacción lenta y de amplio espectro, capaz de inactivar a la mayor parte de los factores de la coagulación y fibrinólisis



## **Mutaciones en el Sistema de la proteína C**

---

activados, a metaloproteasas de la matriz extracelular y a enzimas bacterianos y proteasas de leucocitos. La inhibición de la elastasa leucocitaria es importante puesto que degrada a los factores de la coagulación: factor XIII, fibrinógeno, fibrina y antitrombina. La  $\alpha_2$ -macroglobulina es una globulina de alto peso molecular formada por cuatro subunidades iguales, que actúa mediante un mecanismo diferente al de los inhibidores tipo serpina. Su mecanismo de acción puede compararse al de una jaula, donde el enzima queda atrapado físicamente. La unión del enzima a la molécula del inhibidor produce la rotura de uno o varios enlaces en las subunidades de la molécula del inhibidor, lo cual produce un cambio conformacional en el inhibidor y el enzima queda atrapado dentro, unido por un enlace covalente. La molécula del enzima permanece funcionalmente activa frente a pequeños sustratos capaces de atravesar los “barrotes de la jaula”, pero no así frente a las grandes moléculas proteicas que son sus sustratos fisiológicos. Aunque se han descrito deficiencias familiares de  $\alpha_2$ -macroglobulina, no se ha observado una mayor tendencia trombótica asociada a las mismas.

Otro inhibidor que puede participar en el mecanismo anticoagulante es el C1-Inhibidor, un componente del sistema del complemento, el cual inhibe a algunos de los enzimas de la vía intrínseca de la coagulación. Es un inhibidor tipo serpina, capaz de neutralizar al factor XIIa, XIa y kalikreína. Sin embargo, al igual que en el caso de la  $\alpha_2$ -macroglobulina, las deficiencias de C1-Inhibidor no se han asociado con un mayor riesgo de trombosis.

La  $\alpha_1$ -antitripsina es un inhibidor tipo serpina que inhibe al factor XIa, a la plasmina y a la APC. Deficiencias de este inhibidor de la coagulación tampoco han sido asociadas con una mayor tendencia trombótica.

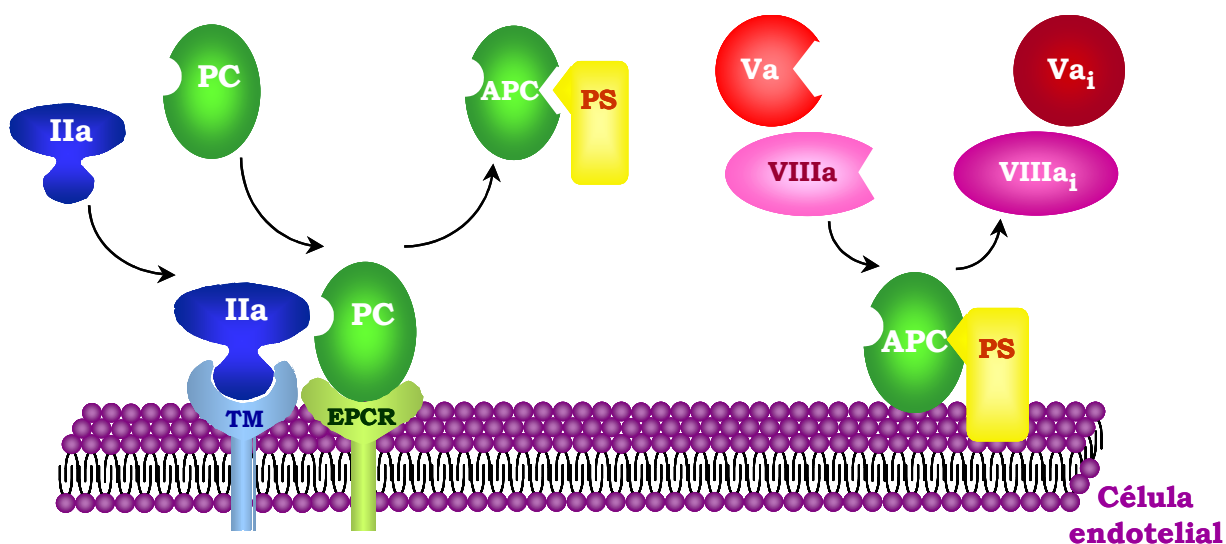
### **1.1.2.2 Sistema de la proteína C**

Junto con la antitrombina y el TFPI, el sistema de la proteína C juega un papel esencial en la regulación del proceso de la coagulación sanguínea, siendo el mecanismo de defensa más importante y efectivo frente a la trombosis. La activación de la proteína C por el complejo trombina-trombomodulina, amplificada por la presencia del EPCR, conduce a la inactivación de los cofactores de la coagulación activados Va y VIIIa, que son esenciales para mantener la generación de trombina. En menor medida, la proteína C puede ser activada por el factor Xa y la plasmina (43). Disfunciones de los componentes de la vía de la proteína C, tales como deficiencias totales de proteína C o proteína S, dan lugar a graves cuadros trombóticos.

Sin embargo, el sistema de la proteína C también participa en otras funciones biológicas importantes. Así, algunos componentes del sistema muestran propiedades antiinflamatorias, profibrinolíticas, antiapoptóticas y neuroprotectoras.

### 1.1.2.2.1 Propiedades anticoagulantes de la proteína C

El sistema de la proteína C, a diferencia de otros mecanismos anticoagulantes, funciona como un inhibidor de la coagulación *a demanda*, capaz de amplificar la respuesta anticoagulante a medida que aumentan los mecanismos procoagulantes. La vía se inicia cuando la trombina, formada durante el proceso de la coagulación, se une a la trombomodulina sobre la superficie de la célula endotelial, como puede observarse en la *Figura 1.3*.



**Figura 1.3. Mecanismo de activación de la proteína C.** La trombina (IIa) generada durante la cascada de la coagulación, se une a su receptor sobre la superficie de la célula endotelial, la trombomodulina (TM), e induce la activación de la proteína C (PC). A su vez, la proteína C se une a su receptor sobre la superficie de la célula endotelial, el EPCR, en la orientación adecuada para potenciar este proceso. La proteína C activada (APC) así formada, debe disociarse del EPCR para ejercer sus funciones anticoagulantes. La proteína S (PS) cumple esta función, formando un complejo con la APC y permitiendo así su disociación del EPCR. Este complejo APC-PS se une a las superficies donde tienen lugar las reacciones procoagulantes e inactiva a los factores de la coagulación Va y VIIIa, impidiendo la generación de los factores IIa y Xa y, por lo tanto, deteniendo la coagulación. En el caso del factor VIIIa, el proceso es a su vez potenciado por el factor V (44).

### 1.1.2.2.1.1

### *Activación de la proteína C*

La trombina se une a las repeticiones 5 y 6 del dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (*EGF*) de la trombomodulina por su región *exosite I*, un gran surco que interviene en la interacción con numerosos receptores y sustratos de la trombina. Esta unión bloquea las actividades procoagulantes de la trombina dependientes de su región *exosite I*, mientras que estimula sus propiedades anticoagulantes, al activar a la proteína C (45). Esta activación tiene lugar mediante la liberación de 12 aminoácidos de la cadena pesada del zimógeno (46). La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel fundamental en la activación de la proteína C, puesto que en ausencia de trombomodulina el calcio inhibe la activación de la proteína C por la trombina dando lugar a un incremento de la  $K_m$  de más de 20 veces (47). En presencia de trombomodulina, el calcio tiene un efecto contrario, estimulando fuertemente la tasa de activación de la proteína C a través del incremento de la  $K_{cat}$  y de la reducción de la  $K_m$  (47, 48). A diferencia de la mayoría de factores de la coagulación vitamina K dependientes, el principal sitio de unión del calcio no está presente en el dominio Gla dependiente de la vitamina K, sino que el único sitio de unión al calcio esencial para la rápida activación de la proteína C en solución por el complejo trombina-trombomodulina está localizado en el dominio proteasa de la proteína C. Así, esta unión del  $\text{Ca}^{2+}$  altera la conformación de la región de activación de la proteína C, convirtiéndola en un mejor sustrato para el complejo trombina-trombomodulina y un peor sustrato para la trombina (47).

La activación de la proteína C por el complejo trombina-trombomodulina es potenciada, ~20 veces, por su receptor específico, el EPCR, localizado en la superficie del endotelio, el cual localiza en dicha superficie a la proteína C (49, 50). Tanto la proteína C como la APC pueden unirse al EPCR con similar afinidad ( $K_d \approx 50$  nM) (51). El EPCR anclado a la membrana de la célula endotelial puede sufrir una rotura proteolítica por metaloproteasa(s) y liberarse al torrente circulatorio (52) dando lugar al EPCR soluble (sEPCR). De hecho, en ciertas patologías como el lupus eritematoso sistémico o la sepsis se ha encontrado un aumento en los niveles de sEPCR (53). La APC unida al sEPCR no tiene propiedades anticoagulantes (54), lo cual puede ser debido a la capacidad del sEPCR de bloquear la unión de la APC a la superficie fosfolipídica, así como a un cambio de especificidad de la molécula de APC (55). A su vez, el EPCR y el factor Va parecen competir por la unión a la APC. Estas observaciones sugieren que la APC debe disociarse del EPCR unido a la superficie de la célula endotelial para poder exhibir su función anticoagulante. Esta función la realiza la proteína S, la cual se une a la APC y disocia al complejo APC:EPCR. La proteína S presenta una fuerte afinidad por las membranas fosfolipídicas cargadas negativamente

(56, 57), lo cual permite colocar a la APC sobre las superficies donde están teniendo lugar las reacciones de coagulación donde intervienen los cofactores activados Va y VIIIa.

La trombomodulina se encuentra distribuida uniformemente en la superficie de la célula endotelial de todos los vasos, con ~50.000 moléculas/célula endotelial (58), excepto en la microcirculación cerebral donde la concentración es más baja (59). Cuando el diámetro del vaso se estrecha, el área relativa de la superficie vascular expuesta a la sangre circulante aumenta exponencialmente desde menos de 3 a más de 3.000 cm<sup>2</sup>/ml de sangre. Por lo tanto, la concentración relativa de trombomodulina disminuye en los grandes vasos (60, 61). Este hecho resultaría en una deficiente activación de la proteína C en los grandes vasos, especialmente teniendo en cuenta que la afinidad entre la proteína C y la trombomodulina es débil ( $K_d \approx 80 \mu\text{M}$ ) (62). Además, la trombomodulina se une a la trombina con una  $K_d \approx 1 - 10 \text{ nmol/l}$  dependiendo de la presencia de condroitin sulfato. Por lo tanto, cuando la trombina circula a través de los capilares, la elevada concentración de trombomodulina tenderá a secuestrar la mayor parte de las moléculas dando lugar a la rápida inactivación de la trombina por sus inhibidores, al bloqueo directo de las reacciones procoagulantes inducidas por ella y a la rápida activación de la proteína C (61, 63, 64). Por el contrario, el EPCR se localiza principalmente en el endotelio de las grandes arterias y venas y presenta elevada afinidad por la proteína C (50, 65). Ello permite una efectiva localización de la proteína C sobre estas superficies y asegura una activación eficaz de la proteína C sobre la superficie de los grandes vasos (49-51, 66). De hecho, estudios en mandriles mostraron que la inhibición, con un anticuerpo monoclonal, de la unión de la proteína C al EPCR reducía un 90% la capacidad de la trombina para activar a la proteína C en respuesta a una infusión de bajos niveles de trombina (67). Asimismo, se ha demostrado la relevancia de ambos receptores, trombomodulina y EPCR, en el desarrollo y control de los procesos coagulantes e inflamatorios al observar que deleciones en los genes que codifican para estas proteínas dieron lugar a la muerte embrionaria temprana en ratones (68, 69).

#### **1.1.2.2.1.2**

#### ***Función de la proteína C activada***

La formación del complejo APC-proteína S permite a la APC interactuar con los factores Va y VIIIa sobre la superficie de la célula endotelial o de la membrana plaquetar (70), inactivándolos proteolíticamente (71, 72). Puesto que éstos no son cofactores enzimáticos, su inactivación no puede llevarla a cabo los inhibidores tipo serpina que inactivan a la mayor parte de los enzimas de la coagulación, sino que la

realiza la APC. La proteína S resulta esencial para la función anticoagulante de la APC (73). Los cofactores activados Va y VIIIa son esenciales en la activación de la protrombina por el factor Xa y en la activación del factor X por el factor IXa, respectivamente, por lo que su inactivación reduce o elimina drásticamente la generación de trombina. Sin embargo, cuando los factores Va y VIIIa forman complejo con los factores Xa y IXa respectivamente, son relativamente resistentes a la inactivación por la APC (74-79). La APC inactiva al factor Va mediante un corte proteolítico en la cadena pesada del factor (80), región que presenta gran homología en su secuencia a la región del factor VIIIa alrededor de la Arg562 donde corta la APC (81). El factor Xa protege al factor Va de la inactivación por la APC mediante la formación de un complejo Va-Xa, lo cual reduce considerablemente la concentración del factor Va libre disponible para la interacción con la APC. Sin embargo, la proteína S es capaz de reducir esta protección desplazando al factor Xa y liberando un sitio de unión en el factor Va para la interacción con la APC (82). A su vez, el factor VIIIa es inactivado tanto por el factor IXa como por la APC (83-85), aunque la inactivación catalizada por la APC es 8 veces más rápida que la inactivación por parte del factor IXa. Por lo tanto, una de las funciones de la proteína S es bloquear, al menos parcialmente, la protección que ejercen el factor Xa y el factor IXa sobre los factores Va y VIIIa ante la inactivación por parte de la APC (86). A su vez, se ha descrito la capacidad de la APC para inactivar a las formas nativas de los factores V y VIII, impidiendo su activación y participación en las reacciones coagulantes (83). Este factor V truncado permanece unido al complejo APC-proteína S, y actúa como un segundo cofactor de la APC en la inactivación de los factores VIII y VIIIa (87).

La antitrombina y el PCI pueden inactivar a la trombina unida a la trombomodulina a una velocidad ~20 veces mayor que a la trombina libre, con una vida media de inactivación de ~2 segundos (88). La trombina inhibida se disocia rápidamente de la trombomodulina regenerando la superficie endotelial. Por lo tanto, al cesar la generación de trombina, el complejo de activación de la proteína C deja rápidamente de generar APC.

### **1.1.2.2.1.3**

### ***Inhibición de la proteína C activada***

Por lo general, los enzimas proteolíticos generados en la circulación sanguínea tienen una vida media de unos pocos segundos. Una excepción es la APC, cuya vida media es de ~10 minutos (89). La lenta inactivación de la APC le permite permanecer en la circulación durante un tiempo relativamente largo, permitiendo que pueda desplazarse hasta donde se encuentran los complejos de la coagulación sobre las

superficies fosfolipídicas procoagulantes de las células, donde los inactiva controlando la propagación de la coagulación. Asimismo, esta lenta inactivación permite a la APC unida al EPCR intervenir en procesos de señalización celular. Los principales inhibidores de la APC son el PCI y la  $\alpha_1$ AT (90, 91). La tasa de inhibición de la APC unida al EPCR por estas proteasas plasmáticas, es equivalente a la tasa de inhibición de la APC libre (54). Otros mecanismos reguladores del sistema anticoagulante de la proteína C son el bloqueo de la proteína S y la inhibición del complejo trombina-trombomodulina por la antitrombina y el PCI. La proteína S circula en plasma en forma libre y unida reversiblemente a la proteína reguladora del sistema del complemento C4b-BP (92). Sin embargo, únicamente la forma libre (~40% de la proteína S plasmática total) presenta actividad anticoagulante como cofactor de la APC (93).

#### **1.1.2.2.1.4**

#### ***Importancia fisiológica del sistema de la proteína C***

La importancia del sistema de la proteína C en la regulación de la coagulación se determinó tras la descripción de deficiencias familiares heterocigotas de proteína C o proteína S asociadas a un aumento del riesgo de trombosis (31, 94-97), y de la existencia de recién nacidos con deficiencia homocigota de proteína C que desarrollan rápidamente purpura fulminans y trombosis masivas mortales si no son tratados inmediatamente (98, 99). El tratamiento con plasma fresco (98), con concentrados ricos en proteína C (100), o con concentrados de proteína C purificada (101-103) puede corregir este defecto de la coagulación, indicando que la tendencia trombótica está directamente relacionada con la deficiencia de la proteína C. De hecho, la terapia sustitutiva con concentrados de proteína C mejoró el estado de pacientes con purpura fulminans producida por meningococos (104, 105). Asimismo, se demostró la efectividad del uso de APC recombinante en el tratamiento de purpura fulminans en una adolescente con deficiencia severa de proteína C que desarrolló anafilaxis al plasma fresco administrado como tratamiento de episodios anteriores de purpura fulminans (106). A su vez, la APC humana fue efectiva en el tratamiento de la coagulación intravascular diseminada (107). En un ensayo aleatorio doble ciego en pacientes con coagulación intravascular diseminada, la tasa de muerte por alguna causa en los 28 días posteriores al tratamiento fue del 20,4% en el grupo de APC (n = 63), la cual fue significativamente menor que la tasa de mortalidad del 40% observada en el grupo tratado con heparina (n = 69) (108). Estudios previos en modelos animales han mostrado el potencial terapéutico de la APC como enzima antitrombótico (109). Así, tanto la APC plasmática humana (110) como la APC humana recombinante (111, 112)

## **Mutaciones en el Sistema de la proteína C**

---

presentaron efectos antitrombóticos inmediatos bajo condiciones de flujo arterial en un modelo animal (mandril) de trombosis, y la activación de la proteína C endógena mediante la infusión de trombina redujo el depósito de plaquetas en el injerto arterial y la incorporación de plaquetas y fibrina en el trombo de tipo venoso, sin disminuir las plaquetas circulantes, el fibrinógeno o la proteína C (113).

Uno de los principales factores genéticos de riesgo trombótico es la presencia de la mutación factor V Leiden (114). El cambio G1691A en la secuencia del gen del factor V, da lugar al cambio de aminoácido Arg506Gln, y este cambio reduce considerablemente la velocidad de inactivación del factor Va por la APC. Así, los individuos portadores de esta mutación presentan una mayor tendencia trombótica, a causa de la deficiencia en este mecanismo regulador de la coagulación.

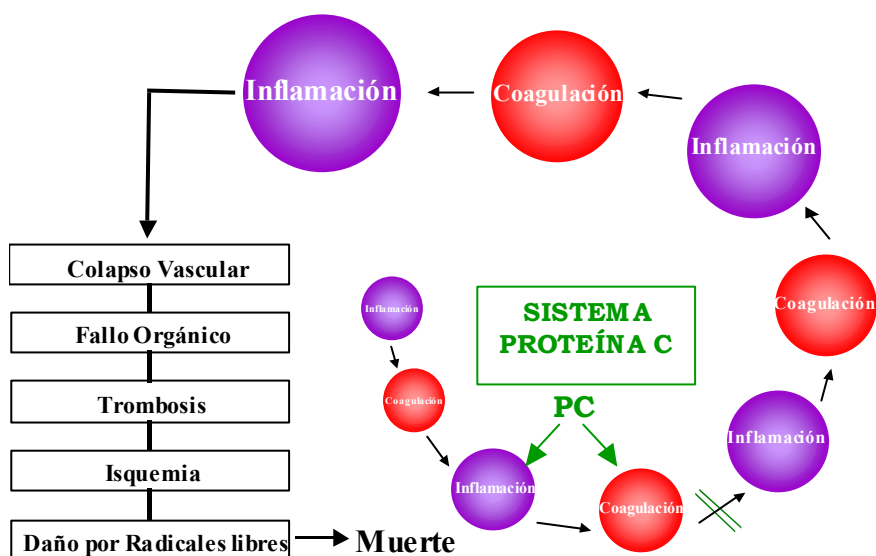
La existencia de complejos APC:PCI y APC: $\alpha_1$ AT *in vivo* en condiciones basales y en diversas situaciones patológicas, demuestra que la APC generada proporciona un mecanismo de anticoagulación sistémica (89, 115-120). Se ha descrito que niveles reducidos de APC circulante pueden ser un factor de riesgo de infarto de miocardio (121), y niveles reducidos de APC están asociados con la elevada incidencia de tromboembolismo venoso (TEV) en la enfermedad de Behçet (122).

Como hemos indicado anteriormente, la vía de la proteína C también parece regular otros procesos biológicos distintos a los de la coagulación (123).

### **1.1.2.2 Propiedades antiinflamatorias del sistema de la proteína C**

La activación de las células endoteliales juega un papel central en el desarrollo y control de la coagulación sanguínea, y esta activación celular constituye el principal nexo de unión entre inflamación, coagulación y daño vascular.

Actualmente existen múltiples evidencias que demuestran que la inflamación favorece el proceso de coagulación mediante una variedad de mecanismos celulares. La trombina generada durante el proceso de la coagulación estimula, a su vez, la inflamación y proliferación celular lo cual, en ausencia de un mecanismo de control adecuado, conduciría a un ciclo de autopropagación que llevaría a la muerte (124). La *Figura 1.4* ilustra estas observaciones.



**Figura 1.4. Interacción entre coagulación e inflamación.** La sepsis es una respuesta sistémica frente a una infección. El patógeno induce una reacción inflamatoria que, en determinadas circunstancias, da lugar a una reacción sistémica que implica el endotelio vascular, los neutrófilos, el sistema hemostático y la regulación hemodinámica pudiendo dar lugar, en último término, al fallo orgánico múltiple y a la muerte. La proteína C (PC) puede inhibir tanto la coagulación como la inflamación, lo que le convierte en un sistema mucho más efectivo para prevenir la muerte que otro sistema que únicamente inhiba uno de los dos procesos. Modificada de Esmon y col. (124).

Sin embargo, puesto que la inflamación y la coagulación no suelen tener efectos letales, deben existir mediadores que bloqueen esta autoamplificación. En los últimos años se han acumulado datos que sugieren que la vía de la proteína C puede proporcionar uno de estos mecanismos, de manera que varios de sus componentes poseen múltiples actividades que contribuyen a la regulación de una variedad de funciones anticoagulantes y antiinflamatorias (125). Otros dos mecanismos reguladores de los procesos inflamatorios son llevados a cabo por la antitrombina y el TFPI.

Normalmente, en condiciones fisiológicas, el árbol vascular proporciona una potente actividad anticoagulante, mientras que la actividad procoagulante es mínima. Sin embargo, la inflamación altera este balance, reduciendo la actividad anticoagulante e incrementando la estimulación de reacciones procoagulantes. Un claro ejemplo es el shock séptico inducido por infección con bacterias gram-negativas. La infección provoca una reducción de los mecanismos anticoagulantes, al reducir el número de moléculas de trombomodulina y EPCR sobre el endotelio y aumentar los procoagulantes, de tal forma que el proceso de coagulación puede proceder de manera generalizada e incontrolada, un proceso denominado coagulación intravascular diseminada. Asimismo, en un subgrupo de pacientes con meningococcemia se observó

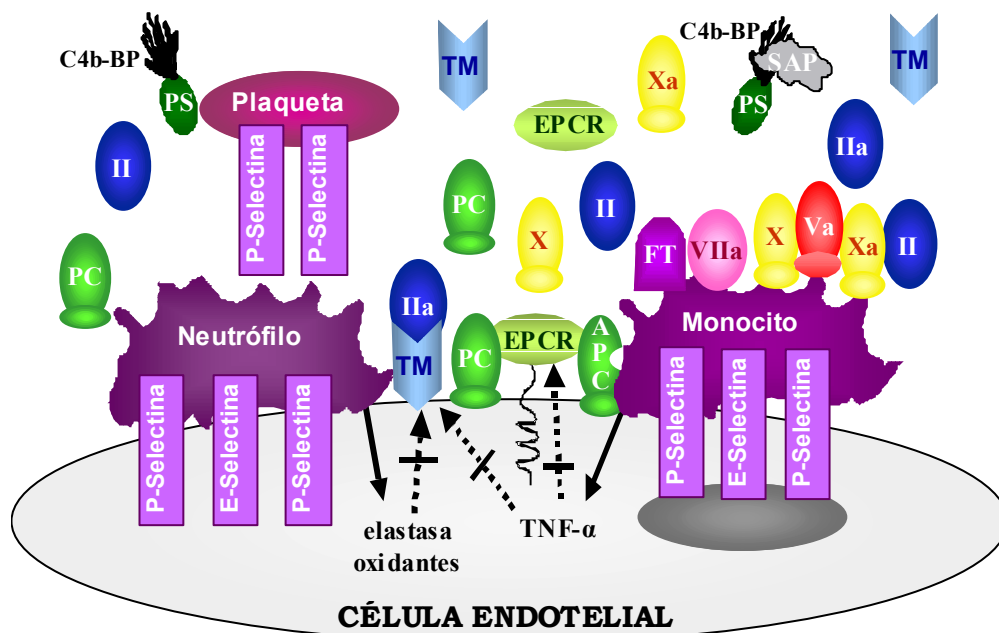


## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

un descenso en la activación de la proteína C y en la expresión de la trombomodulina (126) así como, al determinar los niveles de APC en un grupo de pacientes con sepsis severa, se observó una considerable disfunción de la activación de la proteína C (127).

La *Figura 1.5* muestra un modelo de los procesos modulados por la inflamación, con especial énfasis en el sistema de la proteína C (125, 128). Las citocinas son proteínas de peso molecular menor de 80.000 producidas y segregadas por varios tipos celulares en respuesta a diversas infecciones y estímulos inmunológicos, que pueden ejercer una gran variedad de efectos biológicos a muy baja concentración. Así, las citocinas liberadas tras la inflamación, como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , pueden estimular la expresión de moléculas adhesivas de leucocitos sobre la superficie del endotelio, las cuales inducen la adhesión de los monocitos. Estos monocitos adheridos al endotelio pueden sintetizar más TNF- $\alpha$ , el cual reduce la expresión de la trombomodulina y del EPCR (51, 129-133). Por su parte, los neutrófilos adheridos pueden también disminuir la expresión de trombomodulina, al segregar elastasa, un enzima que degrada a la trombomodulina y libera un fragmento soluble a la circulación, el cual tiene mucha menor actividad anticoagulante que el receptor nativo unido a la membrana de la célula endotelial, puesto que no cuenta con el efecto potenciador del EPCR y no contiene el condroitin sulfato para la unión de la trombina con elevada afinidad (134, 135). La activación de neutrófilos también puede inducir la producción y liberación de proteasas y oxidantes, los cuales pueden disminuir la actividad de la trombomodulina al oxidar un residuo de metionina sensible e incrementar el daño proteolítico y oxidativo del endotelio (136). La principal proteína liberada por los eosinófilos es un potente inhibidor de la activación de la proteína C dependiente de la trombomodulina (137), lo cual contribuiría a la trombosis en enfermedades coronarias causadas por hipereosinofilia. Finalmente, se ha observado que los mediadores de la inflamación también pueden elevar los niveles de C4b-BP, lo cual podría disminuir el nivel circulante de proteína S libre, cofactor esencial de la APC, pudiendo predisponer a trombosis en un estado de respuesta en fase aguda (138, 139).



**Figura 1.5. Influencia de la inflamación sobre la coagulación y el sistema de la proteína C.** La inflamación induce la unión de neutrófilos y monocitos al endotelio, a través de receptores de adhesión inducibles como las selectinas. Además, los monocitos activados liberan citocinas que regulan a la baja la síntesis de trombosmodulina (TM) y de EPCR. A su vez, los neutrófilos liberan proteasas que pueden degradar la trombosmodulina de la pared del vaso, incrementando el nivel de trombosmodulina soluble, la cual presenta menor actividad anticoagulante. La inflamación reduce el nivel de proteína S (PS) libre en la circulación, al aumentar la concentración de C4b-BP y desplazar, por tanto, la mayor parte de la proteína S libre a la forma unida al C4b-BP, sin actividad anticoagulante. Los monocitos expresan FT y unen factor VIIa para iniciar la cascada de coagulación. Las plaquetas activadas pueden unirse a neutrófilos adherentes a través de selectinas, proporcionando una superficie adecuada sobre la cual puede propagarse la coagulación. Modificada de Esmon CT y Fukudome K (125).

Por otra parte, la inflamación puede estimular el inicio de la cascada de la coagulación y su propagación. Los monocitos activados pueden exponer FT en su superficie, el cual unido a un factor VII/factor VIIa e inicia la cascada de la coagulación y la activación plaquetar. Alternativamente, las selectinas expresadas por las plaquetas activadas pueden servir de puentes de unión entre las plaquetas y los neutrófilos y monocitos. Estas plaquetas activadas pueden servir de soporte a las reacciones de coagulación debido a los fosfolípidos negativos expuestos sobre su superficie, a los que se unen los factores de la coagulación y sus cofactores activos. Finalmente, durante la sepsis, los pacientes experimentan una disminución en los niveles de proteína C y proteína S, posiblemente debido a su activación y su posterior degradación por inhibidores proteásicos (140).

A su vez, la coagulación sanguínea no solamente conduce a la activación plaquetar y formación de fibrina, sino que también induce la activación de la célula endotelial, que a su vez contribuye a la activación de leucocitos, estimulando la inflamación. De hecho, los trombos venosos contienen gran cantidad de leucocitos activados cuya adhesión a la superficie del endotelio a través de la expresión de P-selectina y E-selectina en su superficie, es estimulada por el endotelio activado por la trombina (141, 142). Asimismo, los leucocitos y plaquetas activadas pueden formar agregados a través de la P-selectina expresada en la superficie de las plaquetas activadas (142, 143). De hecho, estas interacciones entre las células inflamatorias y plaquetas parecen jugar un papel importante en la generación del trombo, puesto que se ha observado que evitando estas interacciones se puede limitar la trombosis venosa y arterial en modelos animales (144, 145).

La primera evidencia directa de la interrelación entre el sistema de la proteína C y la inflamación vino de los estudios de infusión de APC en mandriles. La APC protegía a los animales de los efectos letales por la infusión de *E. coli* (146), y este efecto era dependiente de la presencia de proteína S (147) y de EPCR (148) puesto que, al bloquear estas proteínas con anticuerpos específicos, aumentaban considerablemente las respuestas coagulante e inflamatoria dependientes de citocinas tras la infusión de concentraciones subletales de endotoxina, las cuales se transformaban en letales. Dependiendo del modelo utilizado, los niveles de IL-6, IL-8 y/o TNF- $\alpha$  estaban elevados al bloquear la vía de la proteína C. Además, la APC también fue capaz de bloquear la producción de TNF- $\alpha$  en un modelo de sepsis en roedores, tanto en circulación (149, 150) como en los tejidos (151-153), de inhibir la adhesión de leucocitos y de proteger frente a un descenso de la presión sanguínea inducida por endotoxinas [para una revisión más completa, ver referencias (128) y (154)].

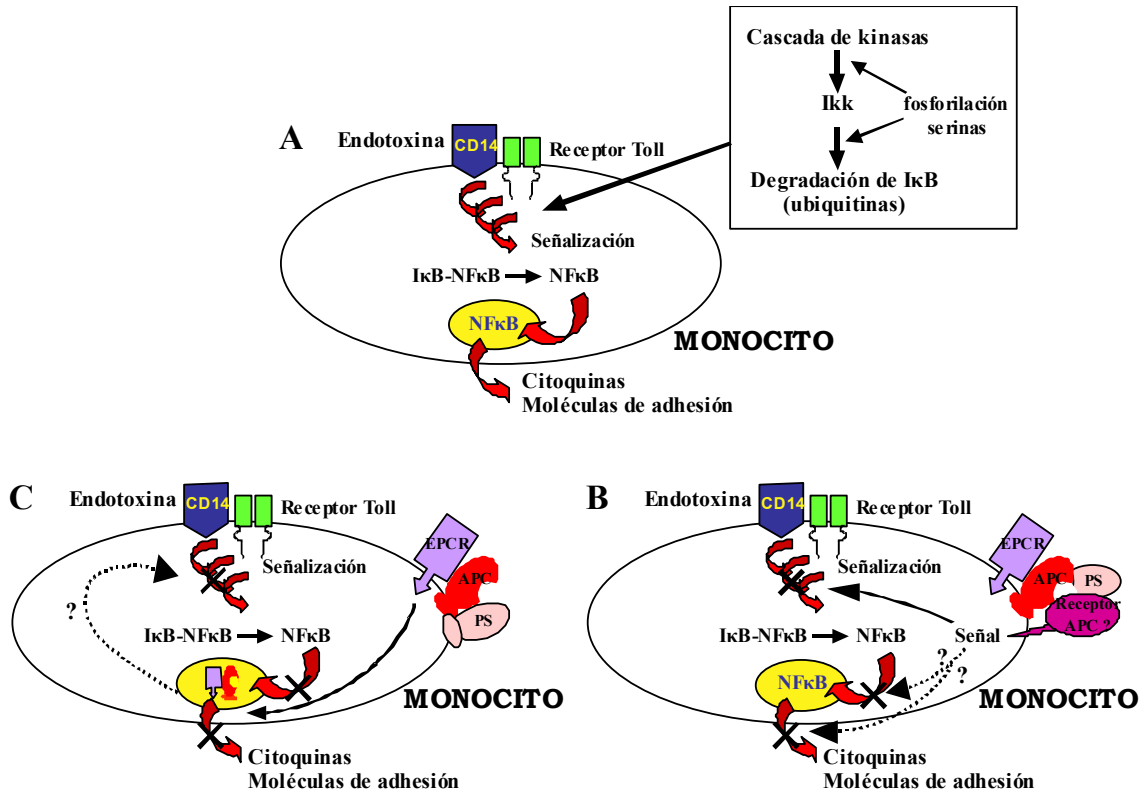
Al igual que la APC, el EPCR parece tener funciones antiinflamatorias. El EPCR puede ser escindido de la superficie del endotelio por la acción de una metaloproteasa inducible, la cual es activada en respuesta a IL-1 $\beta$ , trombina o a la estimulación del endotelio con acetato de forbol miristato (52). Esta ruptura del receptor anclado a membrana disminuiría el potencial de activación de la proteína C y/o la funcionalidad de la APC, lo cual puede ser contrarrestado por un incremento en la transcripción de gen del EPCR inducido por la trombina (155). Así, los niveles de sEPCR parecen estar incrementados en pacientes con lupus eritematoso o sepsis (53). Además, el sEPCR se une a neutrófilos activados en un proceso en el que interviene la unión directa a la proteinasa 3 derivada de leucocitos (156), el autoantígeno de la granulomatosis de Wegener. La proteinasa 3 se une a Mac-1 (CD11b/CD18), una integrina leucocitaria que interviene en la adhesión firme de los leucocitos al endotelio activado. Así, el EPCR podría impedir esta unión de los leucocitos al bloquear las

interacciones de las integrinas (157). El complejo APC-EPCR también parece jugar un papel importante en la prevención de la infiltración de leucocitos a los tejidos (148). Además, algunas de las funciones antiinflamatorias de la APC parecen estar mediadas por la unión de ésta al EPCR (158). Al describirse la estructura del EPCR (159), fue evidente su elevada homología a la familia de proteínas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) tipo 1/CD1 (51, 159), la mayoría de las cuales están involucradas en procesos inflamatorios e inmunidad. Así, las proteínas de la familia CD1 unen antígenos lipídicos y los presentan a los linfocitos T (160, 161), proceso fundamental en la defensa ante infecciones bacterianas como la tuberculosis. También intervienen en la prevención de las respuestas autoinmunes, como el síndrome antifosfolípido (161).

Esta observación sugirió un nuevo papel para el EPCR. La familia CD1/MHC presenta 3 dominios extracelulares llamados  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . El dominio extracelular del EPCR contiene 4 residuos Cys que parecen pertenecer a dos dominios diferentes. El EPCR carece del tercer dominio de la familia CD1/MHC y no interacciona con la proteína  $\beta_2$ -microglobulina, pero sus 2 dominios muestran una homología significativa a los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de la familia de proteínas CD1 y al dominio  $\alpha 2$  de la proteína MHC tipo 1, lo que sugiere que estas proteínas evolucionaron de un ancestro común (51). El primer dominio del EPCR (aminoácidos 17 – 114) contiene 2 sitios potenciales de *N*-glicosilación y su estructura es rica en cadenas  $\beta$ , lo que sugiere que debe formar una hoja  $\beta$ . El segundo dominio del EPCR (aminoácidos 118 – 188) contiene otros dos sitios de *N*-glicosilación y, de forma similar a la familia CD1/MHC, este dominio parece presentar una estructura  $\beta$  limitada. Finalmente, la estructura cristalográfica del EPCR mostró que éste se pliega formando una plataforma de 8 hojas  $\beta$  plegadas que soportan 2 regiones de  $\alpha$ -hélices que, en conjunto, forman un potencial surco de unión para la proteína C y la APC. Al igual que la familia CD1, el EPCR presenta un lípido, en este caso un fosfolípido, fuertemente unido en el surco utilizado por esta familia de proteínas para la presentación de antígenos, lo que sugiere que el EPCR podría intervenir en la presentación de antígenos lipídicos (159). Así, de los 18 residuos que participan en el contacto entre el EPCR y el lípido, 7 son idénticos a los de la molécula CD1d y 6 muestran propiedades similares. Los otros 5 residuos son diferentes, pero corresponden a parte de la estructura no homóloga entre las proteínas. Este lípido es esencial para la unión fuerte de proteínas, aunque se desconoce su papel en las reacciones inmunes asociadas a las infecciones bacterianas. Sin embargo, cabe destacar que el bloqueo de la unión de la proteína C/APC al EPCR exacerba la respuesta inflamatoria (mediante el incremento de IL-6) y la respuesta coagulante (mayor disminución de fibrinógeno e incremento de D-dímeros), ante la infusión de bajas dosis de *E. coli* en mandriles (148). El sitio de unión para la proteína C está fuera de este

surco y en posición distal al dominio transmembrana (162). Esta unión elevaría el sitio activo de la APC respecto de la superficie de la membrana, lo que podría favorecer la actividad proteásica de la APC frente a las proteínas de la superficie celular y podría explicar la dependencia del EPCR en los procesos de señalización celular por parte de la APC (158). A pesar de su tamaño relativamente pequeño, el EPCR puede unir 3 ligandos simultáneamente: la proteinasa 3, la proteína C/APC, y el fosfolípido.

El compendio de todos estos datos y aquellos aportados por estudios con animales de experimentación, permite elaborar un modelo, el cual se muestra en la *Figura 1.6*, por el cual el sistema de la proteína C podría ejercer las funciones antiinflamatorias observadas *in vivo* (128). Las endotoxinas y otros productos bacterianos, fúngicos y virales se unen al receptor CD14 en la superficie del monocito (*Figura 1.6 A*), activando un mecanismo de señalización a través de un receptor tipo Toll, lo que genera una cascada enzimática compuesta de kinasas que conduce finalmente a la activación del último complejo kinasa, el Ikk (163). Este complejo kinasa cataliza la fosforilación de dos serinas conservadas en el extremo N-terminal del inhibidor I $\kappa$ B, el cual es entonces degradado por la vía de la ubiquitina. En la mayoría de las células, incluyendo los monocitos, el NF $\kappa$ B se encuentra en forma inactiva en el citoplasma formando complejo con el inhibidor I $\kappa$ B (164). La activación de las células con lipopolisacárido, citocinas, virus, oxidantes o activadores de la proteína quinasa C, activa rutas de transducción de señales que dan lugar a la fosforilación de la kinasa I $\kappa$ B (165), lo cual resulta en la rápida degradación proteosomal con la subsiguiente liberación del NF $\kappa$ B. Al degradarse el I $\kappa$ B, el NF $\kappa$ B queda funcionalmente activo y sufre una translocación al núcleo, donde es capaz de unirse al promotor de determinados genes induciendo la expresión de moléculas adhesivas y citocinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (165-167). De hecho, se ha observado un mayor grado de translocación del factor nuclear NF $\kappa$ B en una gran variedad de estados patológicos, como la sepsis inducida por endotoxina, cáncer y enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide, el asma y la colitis ulcerosa (166, 168).



**Figura 1.6.** Posibles mecanismos por los cuales el sistema de la proteína C inhibe la inflamación. Modificada de Esmon CT (128).

En este modelo, la APC es transportada por su receptor, el EPCR, a la superficie del monocito, donde se uniría a un receptor desconocido (169), que podría ser el receptor activado por proteasas tipo 1 (PAR-1) (*Figura 1.6 B*). En presencia de la proteína S, este receptor se activaría y enviaría señales para reducir el flujo de calcio intracelular y para inhibir la translocación del NFκB al núcleo (170), reduciendo o inhibiendo la producción de citocinas y de moléculas adhesivas, tal como se observa en estudios *in vivo* en modelos animales. Alternativamente (*Figura 1.6 C*), el EPCR que es capaz de ser translocado al núcleo (171), transportaría a la APC al núcleo donde el complejo APC-EPCR podría modular el perfil de expresión génica reduciendo la capacidad de la célula para facilitar la respuesta inflamatoria (158, 172).

Así, la actividad antiinflamatoria de la APC parece depender de su capacidad para inhibir la producción de IL-1β y TNF-α por parte de las células inflamatorias inducida por el lipopolisacárido, y de la activación y extravasación de leucocitos al lugar del daño tisular. Asimismo, la APC también parece modular la función endotelial, inhibiendo la expresión de las subunidades p50 y p52 del factor nuclear NFκB, lo cual resulta en la inhibición de la adhesión de las células inflamatorias (173). El conjunto de todos estos datos sugiere que la APC es capaz de suprimir la rutas pro-inflamatorias y

estimular los mecanismos de supervivencia celular a nivel endotelial, proporcionando una respuesta adaptativa compleja en la pared del vaso que proteja al organismo del daño vascular.

Por otra parte, la trombomodulina también parece ejercer una importante actividad antiinflamatoria, puesto que inhibe la adhesión de leucocitos al endotelio activado de ratón (174). Esta función es dependiente de su dominio tipo lectina, y de esta manera protege al ratón del daño tisular mediado por neutrófilos. A su vez, en modelos de shock séptico en ratones, la infusión de trombomodulina previene la coagulación intravascular diseminada y el fallo de los órganos (175-179), e inhibe la síntesis de TNF (152, 180). Como se puede observar en la *Figura 1.7*, la trombomodulina es una proteína de membrana compleja con diferentes dominios: un dominio tipo lectina en el extremo amino-terminal (aminoácidos 1 – 154), seguido de una región hidrofóbica (aminoácidos 155 – 222); seis dominios tipo *EGF* (aminoácidos 223 – 462); una región rica en Serina y Treonina con dianas de *N*- y *O*-glicosilación post-traducciona y, en especial, un sitio de unión de condroitin sulfato (aminoácidos 463 – 497); un dominio transmembrana (aminoácidos 498 – 521) y una cola citoplasmática corta (aminoácidos 522 – 557).

En el extremo N-terminal de la trombomodulina se encuentra un dominio con elevada homología a las lectinas (181), proteínas de unión a carbohidratos que intervienen en mecanismos reguladores de la inmunidad e inflamación (182, 183). Asimismo, el dominio tipo lectina de la trombomodulina presenta actividades antiinflamatorias, puesto que protege al endotelio vascular impidiendo la adhesión leucocitaria a la superficie celular (174). Se ha observado que la delección del dominio tipo lectina en ratones aumenta la infiltración de leucocitos en una gran variedad de condiciones experimentales, mostrando una mayor respuesta a la endotoxemia sistémica, a los estímulos proinflamatorios en pulmón y a la isquemia-reperfusión miocárdica. Es posible que el dominio tipo lectina de la trombomodulina compita por la señalización mediada por la selectina, evento que inicia la adhesión firme de los leucocitos (184), por lo que la ausencia del dominio tipo lectina resultaría en el mantenimiento de estas señales y en una mayor expresión de moléculas proadhesivas. Se ha observado una elevada expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en los diferentes tejidos de estos ratones mutados. Estudios *in vitro* han demostrado que la APC media señales intracelulares que inhiben la expresión de NFκB, ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina (173), lo que permite postular que el mecanismo de regulación de la adhesión de leucocitos a la superficie del endotelio vascular que ejerce la trombomodulina nativa, debe estar mediada por señales intracelulares inducidas por el dominio lectina que inhiban la expresión de estas moléculas de adhesión. A su vez, la presencia de este dominio en forma soluble o como parte de la molécula de

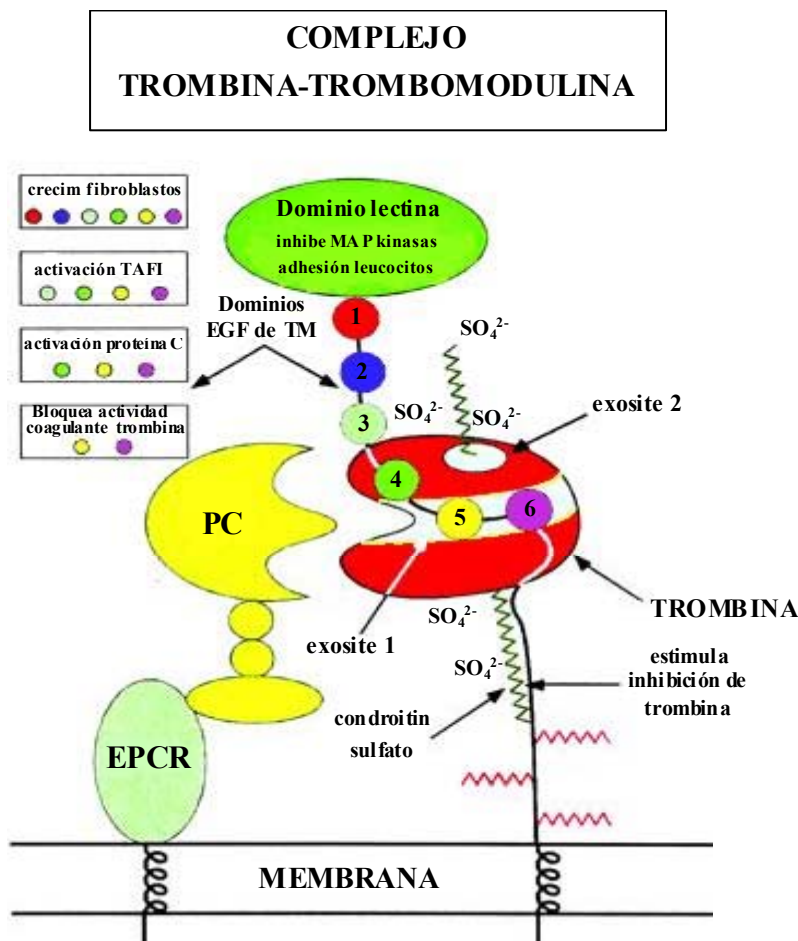
trombomodulina nativa protege frente a endotoxinas sistémicas o inhaladas, y frente al daño por isquemia-reperfusión, puesto que reduce la expresión del NFκB y suprime las vías de las MAP-quinasas, las cuales intervienen en la activación de las células endoteliales e inducen la síntesis de moléculas proinflamatorias (185). Supuestamente, un receptor de señalización en el endotelio resulta bloqueado por el dominio lectina, o activado para enviar señales reguladoras negativas tras el anclaje del dominio lectina. Puesto que la ruta de las MAP-quinasas está inhibida en diferentes estados patológicos, esta actividad antiinflamatoria estaría reducida, incrementando la vulnerabilidad de la vasculatura frente al daño ulterior. Asimismo, se ha observado que la trombomodulina puede funcionar como una molécula de adhesión entre células, puesto que el dominio tipo lectina de la trombomodulina induce la agrupación de las células que se encuentran próximas en cultivo promoviendo la adhesión célula-células a través de la interacción de sus moléculas de trombomodulina mediada por calcio (186). Esta interacción podría ejercer un papel limitante del crecimiento celular.

Las repeticiones tipo *EGF4* – 6 constituyen el dominio funcional mínimo para la activación de la proteína C (187), cuya conformación funcional está determinada por el residuo Asn439 situado en el *EGF6* (188). El sitio de unión para la trombina está localizado en la región Glu408 – Glu426 que conforman el *loop C* del *EGF5* y el *loop* interdominio entre *EGF5* y *EGF6*, y en Pro441 – Ala455 que conforman los *loops B* y *C* del *EGF6* (189). La proteína C se une al cuarto dominio *EGF* de la trombomodulina a través de iones  $Ca^{2+}$  (190), cuyos grupos de residuos Glu357-Tyr358-Gln359 y Glu374-Gly375-Phe376 son esenciales para que la trombomodulina ejerza su función como cofactor (191). Asimismo, se ha observado que la oxidación del residuo Met388 situado en el *loop* interdominio entre *EGF4* y *EGF5* es esencial para la unión a la trombina y para la interacción del complejo trombina-trombomodulina con la proteína C (192). La unión de la trombina a este sitio no sólo acelera la activación de la proteína C ~100 veces, sino que también bloquea la capacidad de la trombina para coagular el fibrinógeno y participar en la activación de plaquetas y células endoteliales (61). Otra función de la trombomodulina, mediada por las repeticiones tipo *EGF3* – 6 (193), es la de acelerar la activación de una procarboxipeptidasa B plasmática (194). Una vez activados, estas enzimas eliminan los residuos Arginina y Lisina carboxi-terminales. Inicialmente se pensó que la diana principal de este enzima sería la fibrina, puesto que al eliminar los residuos Lisina se genera una gran resistencia a la lisis del coágulo (194), por ello se conoce a este enzima como inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina, TAFI. Aunque, posteriormente, se ha descrito que éste es el principal enzima responsable de la inactivación de sustancias vasoactivas, como la anafilatoxina C5a, generadas durante la activación del complemento (195, 196). Así, la presencia de elevadas concentraciones de trombomodulina en la microcirculación, llevaría a la rápida



## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

activación del TAFI y la subsiguiente rápida inactivación de la C5a, mecanismo a través del cual la trombomodulina ejercería un papel protector de la microvasculatura frente al daño causado al desencadenarse el sistema del complemento en situaciones como enfermedades infecciosas y transfusiones incompatibles. Además de intervenir en la activación de la proteína C y en la activación del TAFI, los dominios tipo *EGF* de la trombomodulina son capaces de estimular el crecimiento de fibroblastos (197), lo que sugiere un posible papel de la trombomodulina en la cicatrización de heridas y en un posible desarrollo de la aterosclerosis.

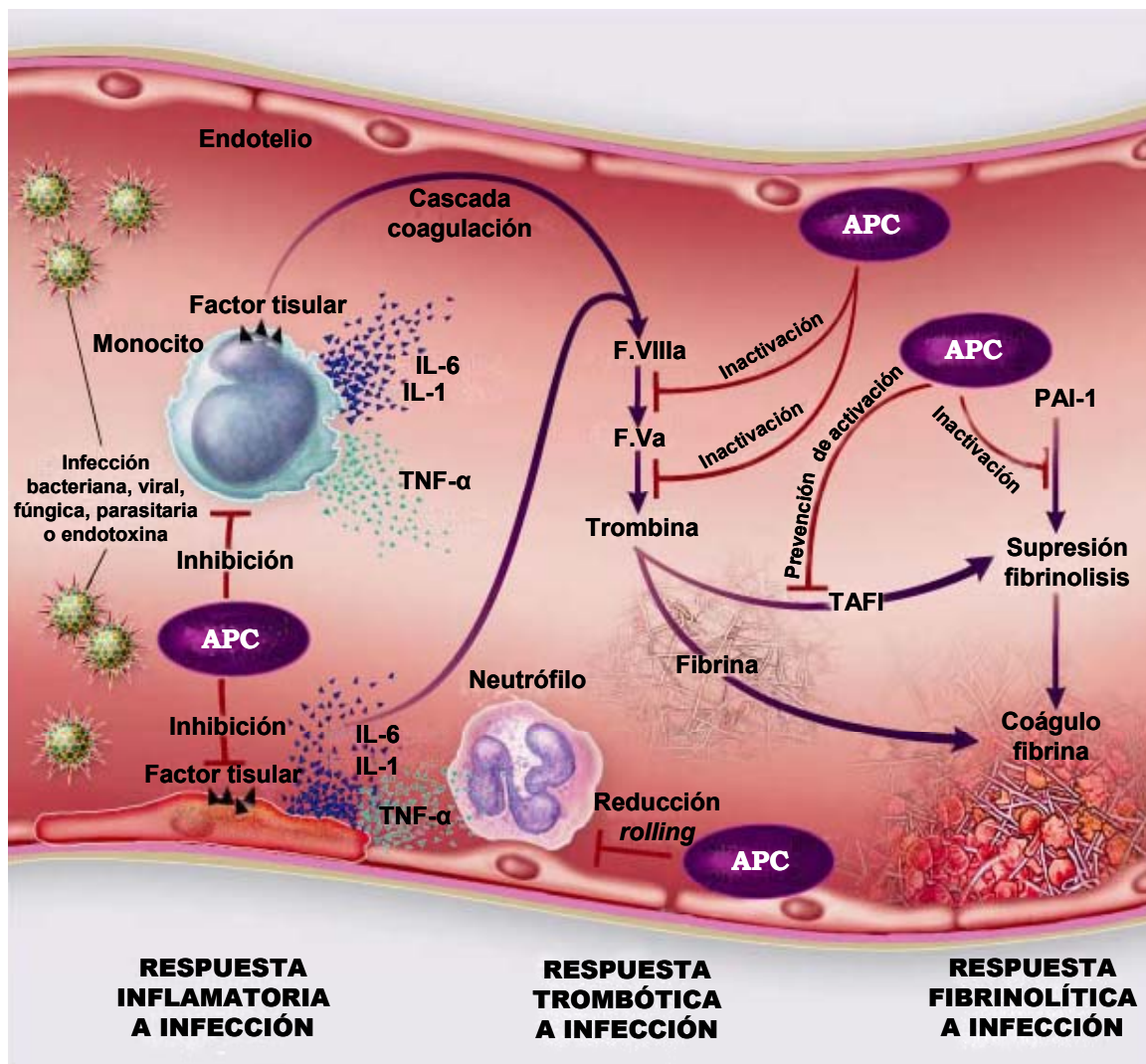


**Figura 1.7. Estructura del complejo trombina-trombomodulina.** La unión de la trombina a la trombomodulina requiere la región *exosite I* de la trombina (representada como una banda clara en el centro de la molécula de trombina) y los dominios tipo *EGF* 4-6 en la trombomodulina. La unión de una molécula de condroitin sulfato a la trombomodulina incrementa su afinidad por la trombina, aunque no es esencial para esta función. El condroitin sulfato interacciona con la región *exosite II* de la trombina, una segunda región muy básica cerca del sitio de unión de la heparina. El dominio tipo lectina de la trombomodulina inhibe la adhesión leucocitaria y la ruta de las MAP-kinasas (174). Otras funciones de la trombomodulina requieren la presencia de diferentes dominios *EGF*. La activación de la proteína C por el complejo trombina-trombomodulina es potenciada por la unión de la proteína C al EPCR a través de su dominio Gla (159). Modificada de Esmon CT (198).

Inmediatamente sobre la membrana existe una región rica en Serina y Treonina, altamente modificada por *O*-glicosilación que estabiliza la molécula de trombomodulina (199) y, a la que se une frecuentemente una molécula de condroitin sulfato. El condroitin sulfato potencia 10 – 20 veces la afinidad de la trombina por la trombomodulina, convirtiendo a la trombomodulina en un inhibidor de la coagulación más potente, alterando la conformación y especificidad de la trombina, y acelerando la inhibición de la trombina por la antitrombina y el PCI (61, 88, 200-202). Sin embargo, no todas las moléculas de trombomodulina están modificadas por el condroitin sulfato, y se desconoce el grado de modificación en los diferentes vasos. Así, la región rica en Ser-Thr parece actuar como espaciador para situar correctamente el sitio de unión a la trombina sobre la membrana, facilitando la actividad como cofactor (189). Finalmente, se han sugerido otras funciones de la trombomodulina, como la internalización y degradación de la trombina en la célula endotelial tras la formación de complejos, protegiendo así las paredes de los vasos y reduciendo la tendencia trombótica (58).

Puesto que la activación de las células endoteliales por parte de la trombina contribuye a numerosos procesos inflamatorios, como la expresión de P-selectina sobre la superficie de la célula endotelial y la síntesis del agonista de neutrófilos, el factor activador de plaquetas (141), la capacidad de la trombomodulina para bloquear estos procesos conlleva un efecto antiinflamatorio indirecto. Además, la unión de la trombina a la trombomodulina incrementa drásticamente la tasa de neutralización de la trombina por las proteinasas inhibidoras plasmáticas (88). El conjunto de estas observaciones sugiere un nuevo papel de la trombomodulina, y la convierten en candidato a nuevo agente terapéutico de gran interés para el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas.

La *Figura 1.8* muestra una visión global del papel modulador que ejerce el sistema de la APC en la respuesta frente a una infección, inhibiendo la trombosis e inflamación y promoviendo la fibrinólisis.



**Figura 1.8.** Posibles mecanismos de acción de la APC para modular la respuesta inflamatoria, procoagulante y fibrinolítica frente a procesos infecciosos (203-208). Las respuestas inflamatoria y procoagulante frente a una infección están íntimamente relacionadas. Los agentes infecciosos y citocinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y la IL-1, activan la coagulación estimulando la liberación del FT de monocitos y endotelio. La exposición del FT induce la generación de trombina y la formación del coágulo de fibrina. Las citocinas inflamatorias y la trombina reducen el potencial fibrinolítico estimulando la liberación de PAI-1 de plaquetas y endotelio. El PAI-1 es un potente inhibidor del activador tisular del plasminógeno, la ruta endógena para el lisado del coágulo de fibrina. Además, la trombina procoagulante estimula numerosas rutas inflamatorias y suprime el sistema fibrinolítico endógeno mediante la activación del TAFI. La generación de APC por el complejo trombina-trombomodulina resulta mermada por la respuesta inflamatoria. El daño endotelial da lugar al descenso de los niveles de trombosmodulina. El resultado final de la respuesta del organismo frente a la infección, puede ser el desarrollo de daño endovascular difuso, trombosis en la microvasculatura, isquemia y disfunción multiorgánica, y la muerte. La APC actúa a diferentes niveles durante la respuesta sistémica a la infección. Ejerce un efecto antitrombótico inactivando los factores Va y VIIIa, limitando la generación de trombina. Como resultado, las respuestas inflamatoria, procoagulante y fibrinolítica inducidas por la trombina resultan reducidas. Estudios *in vitro* indican que la APC ejerce su efecto antiinflamatorio inhibiendo la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 y IL-6) por los monocitos y limitando el *rolling* de monocitos y neutrófilos sobre el endotelio dañado por la unión a selectinas. La APC incrementa de manera indirecta la respuesta fibrinolítica inhibiendo al PAI-1. Modificada de Bernard GR y col.(209).

Como resultado de estos potenciales mecanismos de regulación, el complejo de activación de la proteína C puede resultar dañado en numerosas situaciones de gran relevancia clínica. En un grupo de pacientes con sepsis severa, se observó una disminución en la expresión de la trombomodulina en las células endoteliales, dando lugar a una menor activación de la proteína C (126). Esta pérdida de las funciones inhibitoras de la extravasación de leucocitos, podría comprometer la ya dañada y frágil vasculatura en estos pacientes. Otro ejemplo de la regulación de la trombomodulina ocurre en la granulomatosis de Wegener (210), en la que son muy frecuentes las infiltraciones de leucocitos en la vasculatura. Sin embargo, la situación se complica, puesto que se cree que la diana de los autoanticuerpos es la proteinasa 3, que es la molécula a través de la cual el EPCR se une a la superficie de los leucocitos activados (156). Parece ser que en algunas vasculitis, la reducción de la expresión de la trombomodulina y la inadecuada interacción con el EPCR, podrían contribuir a la progresión de la enfermedad. Otra situación en la que el sistema de la proteína C podría jugar un papel relevante, es el desarrollo de la placa aterosclerótica. En el endotelio que recubre la placa aterosclerótica en humanos, la expresión de la trombomodulina y del EPCR está alarmantemente reducida (211), lo que sugiere una activación de proteína C reducida en estas zonas. Los resultados previamente descritos, sugieren que la disminución en la expresión sería anticipada para facilitar la adhesión de leucocitos y la posible infiltración en el ateroma, lo cual contribuiría al crecimiento de la placa, a la fragilidad de la cubierta fibrosa y a la trombogenicidad de la placa rota.

La implicación del sistema de la proteína C en diversas patologías sugiere que algunos de sus componentes, especialmente la APC y la trombomodulina, puedan convertirse en agentes terapéuticos con gran futuro para el tratamiento de diferentes enfermedades asociadas con la inflamación y la apoptosis, en las que el aumento de las citokinas, el daño ocasionado por la reperfusión y la trombosis contribuyan a la morbilidad y mortalidad de la enfermedad. La sepsis severa, definida como sepsis asociada con la disfunción aguda de órganos, es el resultado de una respuesta inflamatoria y procoagulante generalizada ante una infección (212). En la sepsis severa, se produce una combinación de consumo de la proteína C, inactivación de la proteína S, reducción de la actividad del complejo de activación de la proteína C por oxidación, inhibición mediada por citokinas y liberación proteolítica de los componentes del complejo de activación. Como consecuencia, se produce trombosis en la microvasculatura, incremento de la adhesión de leucocitos y mayor producción de citokinas. De hecho, los niveles de proteína S están reducidos en condiciones de inflamación aguda (213). El tratamiento con APC protege a los pacientes con sepsis severa, y los ensayos con proteína C y trombomodulina para esta enfermedad están en fases iniciales, cada una aportando ventajas e inconvenientes frente a la APC. Se han

utilizado de manera efectiva, tanto la trombomodulina (177, 178) como APC o la proteína C (214, 215), para prevenir los efectos letales de la endotoxina. El motivo que llevó a administrar proteína C, es el marcado descenso en los niveles de la proteína que presentan los pacientes antes de desarrollar una sepsis severa (216). En la meningococemia, se ha observado una buena correlación entre el grado de descenso de los niveles de proteína C y la gravedad de la enfermedad, mejor que con cualquier otro marcador de la coagulación, por lo que se le ha sugerido como marcador del pronóstico en la sepsis y otras enfermedades relacionadas (217). Estos datos están en concordancia con los estudios que mostraron que la APC podía proteger a los animales de una infusión letal de *E. coli*, lo cual sugiere que la terapia sustitutiva con proteína C podría ser segura y efectiva. Numerosos estudios han demostrado los resultados satisfactorios al administrar proteína C (104, 105, 218-221). En general, se ha observado el cese del crecimiento o incluso la regresión de las lesiones cutáneas en estos pacientes y un descenso en la mortalidad comparado con controles históricos. Aunque no se han llevado a cabo estudios aleatorios con proteína C en sepsis severa, los autores de estos estudios sugieren que el pronóstico en términos de supervivencia fue considerablemente mejor de lo que se hubiera predicho a partir de controles históricos. Una posible complicación derivada del uso de proteína C, sería que la expresión del EPCR y la trombomodulina podría resultar reducida por efecto de las citocinas inflamatorias como el TNF, tal y como se ha observado en células endoteliales en cultivo. En algunos pacientes con meningococemia, los niveles de EPCR y trombomodulina y la capacidad de activar la proteína C parecen estar drásticamente reducidos (222). Por lo tanto, en algunos de estos pacientes, la administración de proteína C podría no ser beneficiosa puesto que el sistema de activación está comprometido, ya que el nivel de EPCR sería demasiado bajo para que la proteína C/APC administrada fuera efectiva. De acuerdo con esta hipótesis, estudios histopatológicos de biopsias de piel correspondientes a pacientes con meningococemia han mostrado la expresión marcadamente reducida de EPCR en la vasculatura con trombosis comparada con muestras de biopsias de piel adyacente (222). En consecuencia, se requiere un método relativamente rápido para poder realizar un análisis del potencial de activación de la proteína C en los pacientes y así poder optimizar las opciones terapéuticas. El empleo de APC como terapia en sepsis severa ha superado estudios de fase II y de fase III. Se observó que la APC reducía significativamente los niveles de D-dímeros y de IL-6 (223). En estudio de fase III, el cual fue detenido de forma prematura debido a la eficacia estadística de la APC, el tratamiento con APC dio lugar a una reducción del 19,4% en el riesgo relativo de muerte (209). El riesgo de sangrado severo fue del 3,5% en el grupo del tratamiento y del 2% en el grupo control. Así, la APC parece reducir la mortalidad en gran medida y parece mostrar un perfil riesgo-beneficio favorable. Asimismo, se han realizado numerosos estudios sobre el posible papel terapéutico de la trombomodulina,

fundamentalmente en patologías coronarias. Así, en un modelo de conejo con gran daño arterial se observó que la sobreexpresión de trombomodulina previno la trombosis, la infiltración de leucocitos y la restenosis (224). Aunque parte de la inhibición de la infiltración de leucocitos observada en este modelo fuera debida a la generación de APC, es posible que gran parte de esta inhibición de la infiltración de leucocitos fuera debida a la mayor expresión de trombomodulina, pudiendo ser éste el principal mecanismo responsable de la prevención de la restenosis. En un modelo de conejo con injertos de bypass de venas se observó que la disminución de la trombomodulina tenía lugar durante los días siguientes a la colocación del injerto, lo cual podría contribuir a las complicaciones trombóticas que acontecen (225). La pérdida de las funciones inhibitorias de leucocitos de la trombomodulina, parece contribuir a la trombosis y restenosis que se producen frecuentemente en estos injertos.

#### **1.1.2.2.3 Propiedades antiapoptóticas y neuroprotectoras de la proteína C**

Recientemente se ha descrito que, a nivel celular, la APC es capaz de modular las rutas apoptóticas, induciendo la expresión de la proteína endotelial homóloga a Bcl-2 (A1), de eNOS, y del inhibidor de la apoptosis (IAP), así como inhibiendo la expresión de los genes de la calreticulina y TRMP-2 relacionados con la apoptosis (173). Asimismo, se ha observado que la APC es capaz de inhibir la apoptosis inducida por staurosporina (173), un análogo del ATP que inhibe a la proteína quinasa C y es un potente inductor de la apoptosis.

Esta actividad antiapoptótica, junto con su actividad antiinflamatoria, puede ayudar a explicar la marcada capacidad de la APC para reducir un 19% la mortalidad a los 28 días de tratamiento en pacientes con sepsis grave (209), ya que potentes agentes antitrombóticos como la antitrombina y el TFPI han fallado en similares ensayos clínicos de fase III. La APC puede modular directamente la expresión génica de las células endoteliales de vena umbilical a través de sus efectos sobre los genes antiinflamatorios y de supervivencia celular (173, 226). Estos efectos requieren la presencia del receptor PAR-1 y del EPCR (226). Así, en un modelo de apoptosis inducida por staurosporina en células endoteliales tipo EaHy926 se vio que la inhibición de la apoptosis inducida por staurosporina debida a la APC también es dependiente del PAR-1 y del EPCR (227). Igualmente, en un modelo de ratón se observó que tanto los péptidos de activación de la APC de manera dependiente del EPCR, como los del PAR-1 protegían al animal frente al accidente cerebrovascular isquémico (228). La lenta inactivación de la APC que se encuentra unida al EPCR, le permite intervenir en

## **Mutaciones en el Sistema de la proteína C**

---

procesos de señalización celular. El corte del receptor PAR-1 por el complejo APC-EPCR es uno de los mecanismos de señalización celular más importantes en el desarrollo de las funciones antiapoptóticas de la APC (226, 228). Puesto que el EPCR se expresa fundamentalmente en la superficie endotelial y el PAR está localizado en multitud de tipos celulares, esta dependencia del EPCR podría permitir la activación preferencial de este receptor en el endotelio (226), evitando así la activación de plaquetas y neutrófilos que ocurriría en caso contrario. Se postula que el EPCR une a la APC en la superficie endotelial y sitúa su centro activo cerca del sitio de corte del PAR-1. Asimismo, la inhibición de la apoptosis inducida por staurosporina a través del PAR-1 es específica de la APC, puesto que otros activadores de este receptor como la trombina y varios péptidos agonistas no mostraron un efecto inhibitorio de la apoptosis. Este efecto puede estar mediado por la activación de diferentes cascadas de señalización intracelular. Mientras que la actividad anticoagulante de la APC está inhibida cuando ésta se encuentra unida al EPCR, el EPCR es un cofactor esencial para la actividad antiapoptótica de la APC ya que la activación del PAR-1 por la APC es dependiente del EPCR. Por lo tanto, parece ser que las funciones anticoagulante y antiapoptótica de la APC son independientes, lo que sugiere la posibilidad de utilizar formas mutadas de APC que carezcan de actividad anticoagulante y que mantengan la actividad antiapoptótica en el tratamiento de pacientes para incrementar la supervivencia celular sin incrementar el riesgo de hemorragias. Este efecto de la APC abre nuevas vías de utilidad clínica de este antitrombótico natural.

A su vez, la APC presenta propiedades neuroprotectoras, las cuales están íntimamente ligadas a las propiedades antiapoptóticas. El accidente cerebrovascular isquémico en humanos es ocasionado por oclusiones vasculares trombóticas o tromboembólicas (229, 230). La infiltración cerebral con neutrófilos contribuye al daño isquémico neuronal (231-234). Se ha descrito que niveles reducidos de proteína C constituyen un factor de riesgo para el accidente cerebrovascular isquémico (235), y niveles reducidos de APC (236) y la resistencia a la APC son potenciales factores de riesgo de accidente cerebrovascular (237, 238). A diferencia de otros agentes antitrombóticos como la heparina o el activador tisular del plasminógeno que predispondrían al sangrado en el sistema nervioso central (239-242), niveles elevados de APC no producen hemorragias en estudios experimentales (110, 111, 243, 244). A su vez, la isquemia cerebral (245) y la cirugía de bypass cardiopulmonar (246) dan lugar a la generación de APC, lo cual apoya la hipótesis del papel protector de la APC.

De hecho, en un modelo de isquemia cerebral en ratón la APC mostró potentes efectos neuroprotectores (247, 248), facilitando la restauración del flujo sanguíneo en el cerebro y reduciendo el área del infarto cerebral (248). Asimismo, se observó una disminución en la expresión la molécula adhesiva ICAM-1 en la barrera

hematoencefálica causada por la APC, previniendo la adhesión de neutrófilos en la pared de los vasos dañados y el subsiguiente transporte a través de la barrera hematoencefálica.

Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares responsables del efecto neuroprotector de la APC, parece reducir el daño cerebrovascular atenuando o eliminando la respuesta de los leucocitos en el tejido isquémico, así como que este efecto se debe no solamente a sus propiedades antitrombóticas, sino también a su actividad antiapoptótica, la cual puede proteger directamente a las células endoteliales de la apoptosis inducida por hipoxia (228). Así, la APC protege las neuronas corticales del ratón de dos inductores de la apoptosis, el N-metil-D-aspartato (NMDA) y la staurosporina. La APC previene directamente la apoptosis en el endotelio humano cerebral hipóxico a través de la inhibición transcripcional de la proteína supresora de tumores p53, de la normalización del ratio proapoptótico Bax/Bcl2, de la reducción de las señales de la caspasa-3, y de la translocación nuclear del factor inductor de la apoptosis (AIF). También previene la apoptosis inducida por staurosporina mediante el bloqueo de la activación de la caspasa-8. Este efecto neuroprotector de la APC es llevado a cabo a través de mecanismos diferentes a los que intervienen en la mayor expresión de algunos genes implicados en la ruta de la apoptosis endotelial, como el gen de la proteína antiapoptótica A1 homóloga al Bcl-2 y el gen de la proteína inhibidora de la apoptosis IAP-1, en células endoteliales. La infusión intracerebral de APC redujo, de una manera dosis-dependiente, la excitotoxicidad del NMDA en ratones. A su vez, se ha descrito que la citoprotección del endotelio cerebral por parte de la APC *in vitro* requiere la presencia del EPCR y del PAR-1. La adición de diferentes anticuerpos anti-PARs y el uso de ratones en los que se eliminó el PAR-1, PAR-2 o PAR-3, mostró que este efecto neuroprotector directo de la APC, *in vivo* e *in vitro*, depende de PAR-1 y PAR-3 (249). A su vez, parece ser que las actividad anticoagulante y neuroprotectora que ejerce la APC son independientes, puesto que en un modelo de ratón con isquemia-reperusión únicamente se observaron los efectos neuroprotectores a bajas concentraciones de APC, mientras que no se observó ningún efecto sobre la formación de coágulos de fibrina ni sobre la restauración del flujo sanguíneo (228). Por lo tanto, la APC protege el cerebro del daño isquémico actuando directamente sobre las células cerebrales.

El compendio de estos datos indica que la APC ejerce un papel antiinflamatorio, antitrombótico y neuroprotector frente al accidente cerebrovascular. El principal efecto de la APC parece estar asociado al mantenimiento de la barrera hematoencefálica ante los neutrófilos, pequeñas obstrucciones microvasculares y ante el depósito de fibrina.



### 1.2 FACTORES DE RIESGO DE TROMBOSIS RELACIONADOS CON LA VÍA DE LA PROTEÍNA C

En los últimos años, numerosos estudios han descrito la existencia de defectos en el sistema de la proteína C los cuales están asociados con la enfermedad tromboembólica. Principalmente nos centraremos en los factores de riesgo para el TEV.

La deficiencia heterocigota de proteína C es una patología relativamente común, entre 0,15 y 0,3% de la población general caucásica (250, 251). Estudios clínicos han demostrado que esta deficiencia aumenta el riesgo de TEV (252), especialmente en individuos portadores de un segundo defecto, como la resistencia a la APC (11, 31, 253-255). La deficiencia homocigota de proteína C está asociada a complicaciones trombóticas mortales (99, 256), que deben ser tratadas de forma efectiva mediante la administración de plasma fresco o de proteína C (257, 258). La manifestación clínica de una deficiencia homocigota de proteína C, suele ser purpura fulminans causada por trombosis en la microvasculatura de la piel.

Asimismo, la deficiencia de proteína S está asociada con un mayor riesgo de trombosis (259).

Uno de los principales factores genéticos de riesgo trombótico es la presencia de la mutación factor V Leiden (114), consistente en una mutación puntual en la secuencia del gen del factor V de la coagulación en el que la G en posición 1691 está sustituida por una A. La mutación da lugar al cambio de aminoácido Arg506Gln, y está presente en el 1 – 5% de la población caucásica general y en un 20 – 50% de los pacientes con TEV hereditario (11, 31, 260, 261). El factor Va es esencial para acelerar la coagulación, al actuar como cofactor del factor Xa en la activación de la protrombina. El papel de la proteína C, como hemos visto anteriormente, es el de regular la coagulación inactivando a los cofactores Va y VIIIa. La APC destruye la actividad del factor Va cortando por los enlaces Arg306, Arg506 y Arg679, como puede observarse en la *Figura 1.9*, controlando de esta forma la velocidad y extensión de la coagulación.

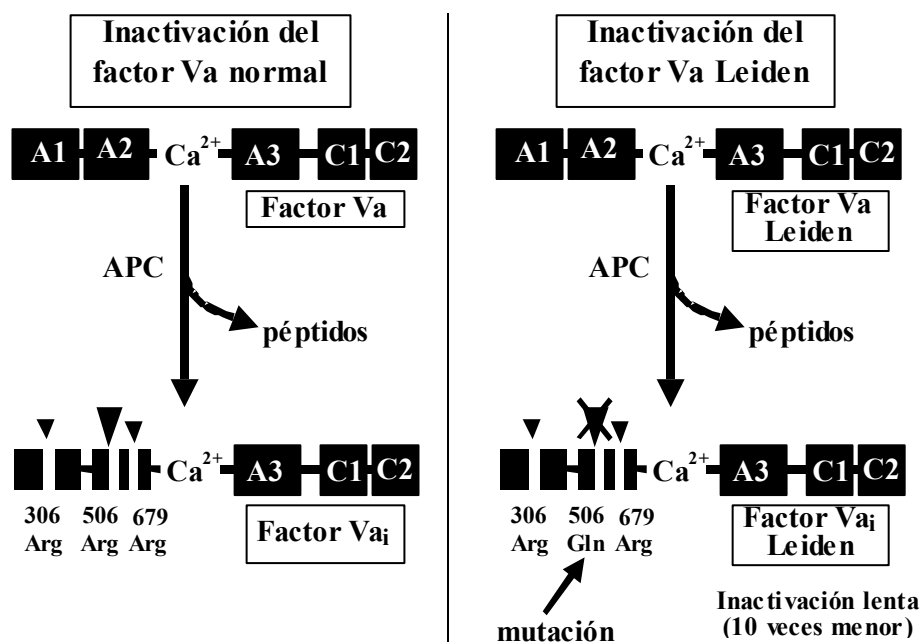


Figura 1.9. Inactivación del factor Va normal y del factor Va Leiden por la APC.

El corte por la Arg506 acelera el corte de las otras dos Argininas. A su vez, el factor V sirve como cofactor para la inactivación del factor VIIIa por la APC (44), para lo cual se requiere la presencia de la proteína S. Así, otra posible función de la proteína S como cofactor de la APC sería estimular selectivamente el corte en la Arg306, orientando el sitio activo de la APC más cerca de este sitio de corte, anulando así la protección por parte del factor Xa (262, 263). En la mutación factor V Leiden, la Arg506 está sustituida por Glutamina, y la APC no puede cortar este enlace. Por lo tanto, la velocidad de rotura de las otras dos Argininas se reduce, la inactivación del factor Va es mucho más lenta, y la coagulación no puede regularse en este punto existiendo, por tanto, una mayor tendencia a la trombosis en los individuos con esta anomalía genética, patología conocida como resistencia a la APC (264).

La mutación factor V Leiden o la resistencia a la proteína C activada no sólo es un factor de riesgo por ella misma, sino que su efecto resulta dramáticamente potenciado por la presencia de otros factores de riesgo, como son las deficiencias de proteína C, proteína S o antitrombina (253, 265-267), el uso de anticonceptivos orales (268, 269), niveles elevados de homocisteína en plasma (270), TEV recurrente tras la terapia anticoagulante inicial (271, 272), edad avanzada (273), embarazo (274, 275), y tabaquismo (276). Además, se ha descrito que los anticonceptivos orales y el embarazo inducen una resistencia a la APC adquirida que es distinta de los cambios en los niveles de proteína S que se han observado en estos grupos de mujeres (277). En la actualidad se desconoce el mecanismo molecular que produce este fenómeno adquirido, pero se ha

demostrado que, independientemente del mecanismo que lo origina, la resistencia a la APC está asociada con el incremento en el riesgo de trombosis (278).

Los anticuerpos antifosfolípidos, los cuales también afectan a la ruta de la proteína C, están asociados con un aumento del riesgo de trombosis (279, 280).

La activación de la proteína C tiene lugar en la superficie de la célula endotelial tras el preciso ensamblaje de al menos cuatro proteínas, proteína C, trombina, trombomodulina y EPCR. Una alteración en dicho ensamblaje debido a defectos moleculares en dichas proteínas, o una alteración en la expresión de los genes que las codifican puede dar lugar a una deficiente generación de APC, con el consiguiente aumento del riesgo de trombosis. De hecho, se han descrito mutaciones en la región promotora del gen que codifica para la trombomodulina, que están asociadas con un mayor riesgo trombótico (281) y mutaciones en la región codificante del gen que están asociadas con un incremento en el riesgo de trombosis, tanto venosa como arterial (282-287). Estudios en modelos animales apoyan esta asociación. Así, la delección del gen de la trombomodulina dio lugar a una muerte embrionaria temprana (68), mientras que la sustitución del gen de la trombomodulina por una copia mutada dio lugar a ratones con una mayor tendencia trombótica, particularmente en el corazón (288). A su vez, la delección del gen que codifica para la proteína C, también dio lugar a la muerte perinatal en ratones causada por una coagulopatía de consumo (289), lo cual vino a confirmar previas observaciones de trombosis masiva y muerte de recién nacidos con deficiencia homocigota de proteína C si no eran tratados inmediatamente tras el nacimiento con plasma fresco (98-100).

### **1.3 DESCRIPCIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEÍNAS QUE FORMAN EL COMPLEJO DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C**

#### **1.3.1 GEN QUE CODIFICA PARA EL EPCR**

En 1994, Fukudome y Esmon (51) determinaron que la APC era capaz de unirse específicamente a células endoteliales en cultivo de una forma dependiente de iones calcio no influenciada por la proteína S. Mediante la búsqueda en una librería de células endoteliales, aislaron el cDNA que codifica para el EPCR.

Mediante análisis de secuencias genómicas y 5'-RACE, Simmonds y Lane (290) y Hayashi y col. (291) determinaron que el gen del EPCR está constituido por 4 exones y se expande a lo largo de 6 kb. El sitio de inicio de la transcripción está situado 79 pares de bases (pb) *upstream* del codón de inicio de la traducción (Met) y 84 pb *downstream* de una secuencia reguladora de tipo caja TATA. A su vez, identificaron la existencia de potenciales dianas de unión de los factores de transcripción AP1, SP1 y AP2 en la región promotora del gen, dos elementos reguladores CAAT (posiciones -436 y -243) y un sitio de reconocimiento de la CAAT *enhancer binding protein* (posición -462). El exón 1 (138 pb; aminoácidos 1 - 24) codifica para la región 5' no traducida, el péptido señal y 7 aminoácidos adicionales; el intrón I tiene una longitud de 2477 pb y contiene una secuencia repetitiva Alu (nucleótidos 1230 - 1590); el exón 2 (252 pb; aminoácidos 24 - 108) codifica para parte de la región extracelular del receptor; el intrón II tiene una longitud de 1217 pb y contiene un elemento repetitivo Alu (nucleótidos 3417 - 3747); el exón 3 (279 pb; aminoácidos 108 - 201) codifica para el resto de la región extracelular del EPCR; el intrón III tiene una longitud de 251 pb; y el exón 4 (659 pb; aminoácidos 201 - 238) codifica para 10 residuos adicionales de la región extracelular, el dominio transmembrana, la cola citoplasmática corta y la mayor parte de la región 3' no traducida. Se han identificado 2 sitios alternativos de poliadenilación en la región 3' del gen.

El análisis de la secuencia del cDNA aislado por Fukudome y Esmon (51) indicó que el EPCR es una proteína integral de membrana de tipo I, codificada por 238 aminoácidos. Tras la eliminación de 17 residuos, la proteína madura está formada por 221 aminoácidos cuya estructura consiste en una secuencia señal de 15 aminoácidos en el extremo N-terminal, un dominio extracelular con 4 sitios potenciales de *N*-glicosilación y 4 residuos Cisteína, una región transmembrana de 25 aminoácidos en el extremo C-terminal, y una cola citoplasmática corta compuesta únicamente por 3 aminoácidos, lo que prácticamente impide su capacidad de señalización. Análisis de Northern blot demostró la presencia de un transcrito de 1,3 kb del gen del EPCR únicamente en líneas de células endoteliales.

Mediante técnicas inmunohistoquímicas, Ye y col. (292) demostraron que el EPCR se expresa fuertemente en las células endoteliales de arterias y venas de corazón y pulmón, con menor intensidad en capilares de pulmón y piel, y la ausencia de expresión en el endotelio de pequeños vasos del hígado y riñón. El análisis por inmunotransferencia demostró que el EPCR se expresa como una proteína de 49 kD, que se reduce mediante desglicosilación a los 25 kD predichos a partir del número de aminoácidos.

## **Mutaciones en el Sistema de la proteína C**

---

El análisis de la estructura secundaria predijo que el EPCR presenta homología con las proteínas MHC tipo 1/CD1 implicadas en la respuesta inmune (293), y se pliega formando una plataforma de 8 hojas  $\beta$  plegadas que soportan 2 regiones de  $\alpha$ -hélices que, en conjunto, forman un potencial surco de unión para la proteína C y la APC. Mediante análisis de híbridos de radiación y FISH, ambos grupos (290, 291) determinaron la localización cromosómica del gen de EPCR en 20q11.2.

### **1.3.1.1 Mutaciones descritas en el gen del EPCR**

Al inicio de esta tesis doctoral, no había sido descrita la existencia de mutaciones en el gen que codifica para el EPCR, por lo que la búsqueda de las mismas se convirtió en uno de los objetivos principales de este estudio.

### **1.3.2 GEN QUE CODIFICA PARA LA TROMBOMODULINA**

En 1987, Wen y col. (294) describieron la secuencia completa del cDNA de la trombomodulina humana. Mediante hibridación molecular de cromosomas (294) localizaron el gen estructural que codifica para la trombomodulina en el cromosoma 20. Mediante hibridación *in situ*, Espinosa y col. (295) localizaron el gen de la trombomodulina en 20p12-cen. Mediante FISH, Yasuda y col. (296) asignaron el gen de la trombomodulina a 20p11, próximo a los genes NEC2 y SSTR5 que están situados en 20p11.2. Mediante el mapeo de híbridos de radiación, Maglott y col. (297) localizaron el gen de la trombomodulina en 20p11.2.

Se han identificado posibles elementos reguladores de la transcripción en la región promotora proximal y distal del gen de la trombomodulina, aunque únicamente se ha demostrado la funcionalidad de una caja CAAT (posición -110 a -105), dos sitios de unión para el factor de transcripción Sp1 (posición -206 y -140) y la región -74 a +20. Asimismo, se ha identificado la existencia de un elemento silenciador, un elemento de respuesta al *shear stress* y 4 elementos de respuesta al ácido retinoico.

La secuencia del gen codifica para una proteína de 60,3 kD compuesta por 575 aminoácidos. El análisis de la secuencia de la proteína sugiere una estructura formada por un péptido señal de ~18 aminoácidos, un dominio tipo lectina de unión a ligandos en el extremo N-terminal de ~223 aminoácidos, una región homóloga al *EGF* de ~236 aminoácidos compuesta por 6 dominios tipo *EGF* en tándem, una región rica en Serina-Treonina de ~34 aminoácidos, un dominio transmembrana de ~23 aminoácidos, y una cola citoplasmática de 38 aminoácidos. La organización de la trombomodulina es

similar a la del receptor del LDL, y la proteína es homóloga a un gran número de otras proteínas que a su vez contienen dominios tipo *EGF*, como el factor VII, factor IX, factor X, factor XII, proteína C, activador tisular del plasminógeno y la urokinasa. A su vez, Jackman y col. (298) describieron la estructura del gen de la trombomodulina, resaltando la ausencia de intrones.

### **1.3.2.1 Mutaciones descritas en el gen de la trombomodulina**

Se han descrito mutaciones en el gen de la trombomodulina, algunas de las cuales han sido asociadas con trombosis venosa y/o arterial. Sin embargo, existen discrepancias sobre esta asociación para algunas de las mutaciones, en ocasiones debido a las diferencias poblacionales entre los estudios.

La primera mutación descrita en el gen de la trombomodulina es un polimorfismo relativamente frecuente consistente en un cambio C1418T que da lugar a un cambio de aminoácido de Alanina a Valina en el residuo 455 de la proteína (287). El polimorfismo está situado en el sexto dominio tipo *EGF*, contiguo al sitio de unión de la trombina y responsable de la activación de la proteína C, lo que sugiere un posible papel modulador de la misma. Pero los autores encontraron que, con respecto a la trombofilia, el polimorfismo es esencialmente neutro, si bien el número de casos y controles analizados fue pequeño. Posteriormente, Öhlin y Marlar (285) analizaron la presencia del polimorfismo en un grupo de 28 pacientes con historia familiar de trombosis y en 35 controles sanos, no encontrando una asociación del polimorfismo con un mayor riesgo de TEV. Finalmente, Aleksic y col. (299) analizaron la frecuencia de este polimorfismo en 302 pacientes con TEV procedentes de dos estudios longitudinales: *Atherosclerosis Risk in Communities Study* y el *Cardiovascular Health Study*, y en 626 controles, no encontrando diferencias en la prevalencia de los diferentes genotipos entre pacientes y controles. Sin embargo se han descrito resultados contradictorios respecto a su relación con la trombosis arterial. Norlund y col. (282) observaron una mayor frecuencia del alelo C en supervivientes de infarto de miocardio (0,82) que en controles (0,72) ( $p = 0,035$ ), lo que sugiere que el cambio de Ala a Val sería funcional. Sin embargo, Ireland y col. (281) analizaron el polimorfismo en 104 pacientes con historia de infarto de miocardio y en 104 individuos sanos, y encontraron 33 individuos portadores del alelo T en ambos grupos. Wu y col. (300) determinaron la frecuencia de este polimorfismo dentro del amplio estudio ARIC en 376 pacientes con enfermedad coronaria (23% negros, 77% blancos) y en 461 controles. Observaron que el alelo T incrementa 6 veces el riesgo de enfermedad coronaria (IC 1,7 – 22,9) en los individuos de raza negra pero no en los individuos blancos, concluyendo que el polimorfismo

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

Ala455Val permite predecir el riesgo de desarrollar una enfermedad coronaria en individuos negros. Mediante estudios de expresión, Nakabayashi y col. (301) demostraron que ambos alelos son funcionalmente equivalentes, puesto que la molécula de trombomodulina con el alelo Ala o Val en posición 455 presenta una actividad similar como cofactor en la activación de la proteína C.

La segunda mutación descrita es un cambio G1456T que predice un cambio de aminoácido Asp468Tyr en la región rica en Serina-Treonina. Fue descrita en un hombre de 45 años de raza hispana con embolismo pulmonar el cual, a su vez, presentaba niveles reducidos de trombomodulina soluble en plasma (285). Faioni y col. (302) no encontraron la mutación en 100 pacientes con TEV y 100 controles sanos, concluyendo que no contribuye al TEV en la población italiana. Diversos grupos han llevado a cabo estudios de expresión transfectando células COS-7 con vectores portadores de la mutación, y observaron una distribución normal de la trombomodulina mutada sobre la superficie de la membrana celular, así como una actividad normal (303, 304).

En 1997, Öhlin y col. (284, 286) describieron 6 mutaciones en el gen de la trombomodulina entre pacientes no relacionados entre sí y familias con enfermedad tromboembólica hereditaria: G127A (Ala25Thr), G129C (Ala25Ala), G236C (Gly61Ala), G543A (Glu163Glu), C1483T (Pro477Ser) y C1502T (Pro483Leu). Aunque algunas de estas mutaciones parecen ser responsables de los episodios trombóticos en algunas de las familias estudiadas, los resultados sugieren la existencia de múltiples factores de riesgo y la ausencia de cosegregación perfecta entre las mutaciones en la trombomodulina y el riesgo de TEV (305). La mutación G127A que da lugar al cambio Ala25Thr, ha sido asociada con un mayor riesgo de infarto de miocardio especialmente en hombre jóvenes y en presencia de otros factores de riesgo adicionales (283), aunque Norlund y col. (306) no encontraron una asociación entre la mutación y el infarto de miocardio en la población sueca. Tampoco se ha encontrado asociación entre la mutación y la enfermedad cerebrovascular (307). Mediante un modelo realizado por ordenador, se ha observado que esta mutación está situada en una región expuesta del dominio lectina, por lo tanto la mutación Ala25 podría alterar la hidrofobicidad global y/o la capacidad de interacción con otras proteínas resultando en un cambio de función, pero no se observó una expresión anormal sobre la superficie celular o una función alterada del receptor (304). Kunz y col. (304) observaron que la mutación Pro477Ser dio lugar a una reducción del 23% en la expresión de la trombomodulina y a un incremento de 4 veces en la  $K_m$ , pudiendo afectar su actividad como cofactor. La mutación Pro483Leu, redujo ligeramente los niveles de expresión de la proteína pero sin modificar su funcionalidad. Está situada en la región rica en Ser-Thr, y posiblemente da lugar a un cambio conformacional que reduce ligeramente la eficiencia del tráfico interno hasta la membrana celular, la eficiencia de la glicosilación,

o la estabilidad de la proteína mutada. Por el contrario, observaron que la mutación Gly61Ala daba lugar a una molécula de trombomodulina con expresión y función normales.

Ireland y col. (281) encontraron 3 mutaciones en el promotor del gen de la trombomodulina de pacientes con infarto de miocardio: C-133A, G-33A y GG-9/-10AT, todas ellas situadas en regiones cercanas a potenciales sitios de unión de factores de transcripción. Una de ellas, G-33A, es frecuente en la población china (308), y está significativamente asociada con la enfermedad coronaria incrementando el riesgo de infarto de miocardio y aterosclerosis especialmente en hombres jóvenes, lo cual resulta potenciado con el tabaquismo (309, 310). Sin embargo, no se ha observado una clara asociación entre la mutación G-33A y una disminución de la expresión del gen (311).

### **1.3.3 GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTROMBINA**

Mediante el análisis de un panel de DNA de células híbridas somáticas e hibridación *in situ* utilizando el cDNA y sondas genómicas, Royle y col. (312) asignaron el gen de la protrombina humana al cromosoma 11, en la región 11p11-q12. Además, se encontró una secuencia potencialmente homóloga en el cromosoma X. Degen y Davie (313) describieron la secuencia nucleotídica del gen de la protrombina humana. El gen se expande a lo largo de 21 kb, y está compuesto por 14 exones separados por 13 regiones intrónicas, siendo la molécula de trombina codificada fundamentalmente por los exones 8 – 14. El tamaño de los exones oscila entre 25 y 315 pb, mientras que el de los intrones oscila entre 84 y 9.447 pb, los cuales constituyen el 90% del gen.

El promotor del gen de la protrombina carece de caja TATA (313). Presenta múltiples sitios de inicio de la transcripción formando un *cluster* en la región –40 a –20 del codón de inicio de la traducción (314-317). La regulación de la transcripción del gen de la protrombina es peculiar. Mientras que la mayor parte de los genes son regulados a través de elementos en los promotores dentro de los 100 – 200 nucleótidos anteriores al sitio de inicio de la transcripción, la actividad del promotor de la protrombina está fundamentalmente regulada por un *enhancer* situado ente los nucleótidos –922 y –845 respecto del sitio de inicio de la transcripción (314, 315). Este elemento es activo a una determinada distancia y funciona en ambas orientaciones, es específico de tejido hepático y también actúa sobre los promotores de otros genes. A su vez, existe un elemento en el promotor proximal, en posición –400, responsable de la baja actividad basal del promotor. Sin embargo, no se han identificado mutaciones en la región



## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

reguladora en 5' del gen en individuos con hiper- e hipoprotrombinemia (318, 319). Se han identificado posibles sitios de unión en el *enhancer* para los factores de transcripción específicos de tejido hepático HNF4- $\alpha$ , HNF1- $\alpha$  y HNF3- $\beta$  (FOXA2), para los factores ubicuos Sp1 y Sp3, y para un factor de transcripción no identificado. La unión de los factores HNF4- $\alpha$ , HNF3- $\beta$  y Sp1/Sp3 es esencial para la regulación de la expresión del gen de la protrombina (320).

La protrombina humana tiene un peso molecular de 72.000, y está compuesta por 579 aminoácidos que conforman 5 dominios funcionales: un pre-pro péptido necesario para la secreción y la  $\gamma$ -carboxilación, el dominio Gla que contiene los residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, 2 dominios *kringle* (aminoácidos 63 – 144 y aminoácidos 144 – 249) para la interacción con cofactores, y el dominio catalítico serin proteasa. El sitio activo de la trombina está situado en un valle formado por dos *loops*, los cuales limitan el acceso al sitio activo y, por tanto, determinan la especificidad de corte por la trombina. A su vez, existen dos dominios *exosite*. El dominio *exosite I* une al fibrinógeno, y es responsable del secuestro de la trombina en los coágulos de fibrina. La trombomodulina compite por este sitio de unión y, al mismo tiempo que bloquea la unión del fibrinógeno, cambia la preferencia de corte de la trombina hacia la proteína C anticoagulante. El dominio *exosite II* presenta un papel inhibitorio clave al proporcionar el sitio de unión a la heparina para formar el complejo con la antitrombina.

La protrombina es miembro de una familia de proteínas que requieren la vitamina K para su síntesis completa. La vitamina K es un cofactor de la reacción que convierte un total de 9 – 12 residuos de ácido glutámico en el extremo N-terminal de estas proteínas, en residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico. Los residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico crean sitios de unión para iones metálicos que, cuando están ocupados por un ligando, estabilizan la estructura terciaria de los dominios Gla facilitando la unión de estas proteínas a fosfolípidos y, por tanto, la coagulación dependiente de calcio y su regulación. La protrombina humana contiene 10 residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico en su dominio Gla de 39 aminoácidos, en las posiciones 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29 y 32. La pérdida de sólo 3 residuos Gla en la protrombina puede evitar la unión de iones calcio, la pérdida de las propiedades de unión a fosfolípidos y la pérdida de la actividad procoagulante (321).

La protrombina es una glicoproteína plasmática que es activada por el factor Xa mediante el corte entre Arg273 y Thr274 para liberar la región situada en el extremo N-terminal que contiene los residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, y entre los residuos Arg322 e Ile323, para dar lugar a la molécula trombina enzimáticamente activa, compuesta por una cadena A de 36 aminoácidos y una cadena B de 259 aminoácidos. La tasa óptima de conversión de protrombina a trombina requiere la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ,

factor Va y la superficie de membrana. Así, durante su síntesis, la protrombina sufre diversas modificaciones post-traduccionales como glicosilación, carboxilación de 10 residuos Glu en el dominio Gla N-terminal, y el corte del péptido señal y del propéptido.

### **1.3.3.1 Mutaciones descritas en el gen de la protrombina**

En 1955, Quick y col. (322) describieron la existencia de una variante de protrombina disfuncional congénita, la protrombina Quick, responsable de unos niveles de protrombina funcional anormalmente reducidos. Posteriormente, se han identificado numerosas variantes de protrombina responsables de una alteración en los niveles o en la actividad de la proteína, que han llevado a la clasificación de dichas variantes de la protrombina en función del fenotipo que inducen. Así, la **disprotrombinemia** (deficiencia tipo II) se caracteriza por la síntesis de una variante de la proteína que puede ser detectada por métodos inmunológicos, pero cuya funcionalidad está reducida o resulta ser biológicamente inactiva. La **hipoprotrombinemia** (deficiencia tipo I) se caracteriza por la síntesis de niveles muy reducidos de proteína, la cual es funcional, o incluso la ausencia de proteína. Finalmente, la **hiperprotrombinemia** (deficiencia tipo I) se caracteriza por la síntesis de niveles anormalmente elevados de la proteína. A su vez, se ha descrito la **deficiencia de protrombina**, una enfermedad hemorrágica autosómica recesiva, que se caracteriza por la combinación de 2 fenotipos: hipoprotrombinemia y disprotrombinemia, resultado de la heterozigosis de los padres para diferentes variantes de la protrombina (heterozigoto compuesto).

La hipoprotrombinemia en homocigosis se caracteriza por la existencia de hemorragias severas, mientras que la tendencia hemorrágica de la disprotrombinemia es variable, aunque suele existir una buena correlación entre los niveles de protrombina funcional y la severidad de las manifestaciones clínicas. Sin embargo, la hiperprotrombinemia se caracteriza por una mayor tendencia trombótica.

Las variantes funcionalmente anormales suelen producirse por mutaciones que dan lugar a un cambio de aminoácido en la parte de la molécula que corresponde a la región de la trombina enzimáticamente activa o en los lugares donde el factor Xa corta el profrAGMENTO inicial o corta la molécula de trombina.

La primera mutación en el gen del factor II fue descrita en 1986 por Rabiet y col. (323), el cual identificó la mutación en la secuencia del gen que da lugar a la variante protrombina Barcelona, caracterizada por unos niveles antigénicos normales pero baja actividad coagulante (disprotrombinemia). Observó que el cambio de aminoácido

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

Cys273Arg elimina uno de los sitios de corte por el factor Xa necesario para la generación de trombina a partir del zimógeno inactivo. Posteriormente, se han identificado las mutaciones que dan lugar a las variantes de protrombina previamente descritas, responsables de hipoprotrombinemias, hiperprotrombinemias o disprotrombinemias. La mutación más ampliamente estudiada en el gen del factor II fue descrita por Poort y col. (324), consiste en el cambio G20210A en el nucleótido 3'-terminal en la región 3' no traducida del mRNA, y da lugar a elevados niveles de protrombina en plasma y a un mayor riesgo de trombosis venosa y arterial (325, 326). Sin embargo, el riesgo de recurrencia de TEV espontáneo en los individuos portadores de la mutación es similar al riesgo de los pacientes con genotipo normal (327). La mutación da lugar a una ganancia de función, puesto que la presencia del alelo 20210A modifica la eficiencia de la señal de corte en la región 3' dando lugar a un mayor reconocimiento, mayor procesado del extremo 3', mayor acumulación de mRNA y, en consecuencia, mayor síntesis proteica (328, 329). Asimismo, se ha descrito que la variante 20210A crea un sitio de poliadenilación más eficiente que el sitio de poliadenilación principalmente utilizado en presencia del alelo 20210G (74% de mRNAs poliadenilados en posición 20212), dando lugar a un mRNA que se traduce con mayor eficiencia (330) o al incremento de mRNA (331) y, en definitiva, a una mayor síntesis proteica. Finalmente, se ha sugerido que la mutación está asociada a una mayor glicosilación de la protrombina, lo que le confiere una mayor estabilidad (332). Se ha observado una variación poblacional en la prevalencia del polimorfismo G20210A, siendo del 3% en la población del sur de Europa, del 1,7% en el norte de Europa, y prácticamente inexistente en las poblaciones de origen asiático y africano (333).

En la actualidad, hay descritas un total de 39 mutaciones en el gen que codifica para el factor II: 31 sustituciones nucleotídicas con cambio de sentido o sin sentido, 2 sustituciones nucleotídicas que modifican los sitios de splicing, 2 sustituciones nucleotídicas que modifican secuencias reguladoras, 3 pequeñas deleciones y 1 pequeña inserción. Del total de las mutaciones descritas, 21 están asociadas con una deficiencia de protrombina (20 cambios nucleotídicos y 1 micro-lesión), 10 están asociadas con disprotrombinemia (producidas por cambios nucleotídicos), 5 están asociadas con hipoprotrombinemia (2 cambios nucleotídicos y 3 micro-lesiones), 1 está asociada con elevados niveles de protrombina plasmáticos (cambio nucleotídico) y 2 están asociadas con trombosis venosa (producidas por cambios nucleotídicos). Para mayor información, consultar los datos disponibles para el gen del factor II en la página web *Human Gene Mutation Database* (<http://uwcmml1s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/119894.html>).

### 1.3.4 GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA C

En 1987, Naylor y col. (334) localizaron el gen que codifica para la proteína C en el cromosoma 2 mediante Southern blot. Estudiando una translocación, Long y col. (335) localizaron el gen en 2pter-q37. Posteriormente, Kato y col. (336) localizaron el gen en 2q14-q21 mediante hibridación *in situ* con una sonda de DNA genómico correspondiente a los 3 primeros exones. Finalmente, Patracchini y col. (337) acotaron su localización en 2q13-q14.

El gen de la proteína C se expande a lo largo de 11,2 kb, contiene 9 exones y 8 intrones, la mayor parte de los cuales separan dominios funcionales en la proteína, de manera similar a otras proteínas vitamina K dependientes (338). El mRNA de la proteína C tiene 1795 pb e incluye una región 5' no traducida (53 pb del exón 1 y 21 pb del exón 2), la región codificante de la proteína (exones 2 – 9), y una región 3' no traducida (294 pb, exón 9). Así, el exón 2 codifica para el péptido señal, el exón 3 codifica para el propéptido y el dominio Gla, el exón 4 codifica para un motivo aromático helicoidal corto, los exones 5 y 6 codifican para los 2 dominios *EGF*, el exón 7 codifica para los péptidos de unión y de activación, y los exones 8 y 9 codifican para el dominio serín proteasa con el sitio catalítico, el *pocket* hidrofóbico, los sitios de unión para el factor Va y una región *exosite*. El principal sitio de inicio de la transcripción está situado a 65 pb del primer límite intrón-exón, es decir, a 1513 nucleótidos del codón de inicio de la traducción en el exón 2 (339).

Tsay y col. (340) analizaron los elementos reguladores en el promotor del gen de la proteína C. Un fragmento de DNA correspondiente a los nucleótidos –418 a +45 confirió especificidad de tejido hepático, mientras que el fragmento –88 a +45 fue suficiente para la actividad basal del promotor. Encontraron 5 sitios de unión para factores de transcripción específicos de tejido hepático, así como sitios de unión para los factores HNF-1, HNF-3 y NF-I, los cuales intervienen en la regulación transcripcional del gen de la proteína C. Asimismo, se ha identificado un sitio de unión de factores específicos de tejido hepático y Sp1 en el exón 1 no traducido, y una región silenciadora y dos regiones *enhancer* de la expresión del gen en la región promotora distal y en el intrón I (341).

La proteína C es una glicoproteína plasmática vitamina K dependiente de 62 kD, que es sintetizada en el hígado como una única cadena de 462 aminoácidos y circula en forma de doble cadena inactiva (342). Tras la síntesis sufre las siguientes transformaciones post-traduccionales: corte del péptido señal y del propéptido, glicosilación de 4 residuos Asn (residuos 97, 248, 313 y 329),  $\gamma$ -carboxilación de los 9 residuos Glu del dominio Gla,  $\beta$ -hidroxilación de Asp71, y corte del péptido de unión

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

de las cadenas ligera y pesada (Lys156-Arg157), dando lugar a la proteína madura con la cadena ligera y la cadena pesada unidas por un puente disulfuro.

La proteína C madura está compuesta por un dominio Gla en el extremo N-terminal (aminoácidos 1 – 45). Este pequeño dominio se caracteriza por la presencia de 9 residuos de ácido glutámico (Glu) en las posiciones 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, y 29. Estos residuos son modificados post-traduccionalmente a residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla), modificación indispensable para la unión del calcio y para el correcto plegamiento del dominio (343). La unión del dominio Gla a las superficies fosfolípicas cargadas negativamente resulta crucial para que se lleve a cabo la actividad anticoagulante de la APC. Además del dominio Gla, la cadena ligera de la proteína C (22 kD) contiene 2 dominios tipo *EGF* (aminoácidos 46 – 91 y 92 – 136). La cadena pesada de la proteína C (40 kD) está formada por la región conectora (aminoácidos 137 – 184, que incluye un péptido de activación en posición 158 – 169) y un dominio serín proteasa (aminoácidos 185 – 419) que contiene la triada catalítica: His211, Asp257 y Ser360 (344). Cuando la trombina se une a la trombomodulina sobre la superficie de la célula endotelial, su actividad procoagulante se convierte en anticoagulante activando a la proteína C a través del corte del enlace peptídico Arg169 – Leu170. A continuación, se libera el péptido de activación mediante el corte proteolítico detrás de los aminoácidos Lys(-2) – Arg(-1), y se elimina el dipéptido Lys156-Arg157 que conecta las cadenas ligera y pesada. Durante su activación, la proteína C interacciona con la trombina y con la trombomodulina, y se ha observado que el cluster cargado positivamente situado en los *loops* 37, 60 y 70 en el dominio serín proteasa de la proteína C es importante para la eficiente interacción con la trombomodulina (345-348). Esta misma región de la proteína C está implicada en la unión de la heparina (349) y en la inactivación del factor Va. Según experimentos realizados *in vitro* utilizando trombomodulina reconstituida en membranas fosfolípicas de diferentes composiciones, la activación de la proteína C es más eficiente en presencia de fosfolípidos cargados negativamente, lo que sugiere que el dominio Gla de la proteína C interacciona con la membrana durante su activación (348). Sin embargo, la situación *in vivo* podría ser diferente puesto que los fosfolípidos cargados negativamente no se encuentran expuestos en el endotelio. Puesto que el EPCR potencia la activación de la proteína C, posiblemente el dominio Gla de la proteína C interacciona directamente con el EPCR (157) a través del surco de unión a fosfolípidos (159).

La estructura primaria de la proteína C es similar a la del grupo de factores de la coagulación de la protrombina. Principalmente se asemeja al factor X, y presenta unas cadenas polipeptídicas ligera y pesada unidas por puentes disulfuro. Foster y Davie (344) observaron que la secuencia de DNA que codifica para la región catalítica cercana

a la Serina del sitio activo de la proteína C, muestra una gran homología (de DNA y aminoácidos) con la protrombina, el factor IX, el factor X y otras 3 serín proteasas vitamina K dependientes del plasma. Santamaría y col. (350) clonaron el cDNA del gen de la proteína C humana. A su vez, Plutzky y col. (338) observaron una elevada similitud en la estructura de los exones del gen del factor IX (situado en el cromosoma X) y en la del gen de la proteína C (situado en el cromosoma 2).

#### **1.3.4.1 Mutaciones descritas en el gen de la proteína C**

Desde que en 1987 Romeo y col. (351) describieron las primeras mutaciones en el gen de la proteína C en pacientes con trombofilia hereditaria causada por una deficiencia de proteína C, numerosos estudios han descrito la presencia de alteraciones genéticas en la secuencia del gen que codifica para esta proteína, muchas de las cuales son responsables de una deficiencia de proteína C.

La mayor parte de los casos de deficiencia de proteína C son debidas a un defecto cuantitativo. La deficiencia de proteína C con una mutación que de lugar a una disminución en la síntesis de la proteína se denomina **deficiencia tipo I**, y aquella que de lugar a la síntesis de una proteína disfuncional se denomina **deficiencia tipo II** (352).

La deficiencia de proteína C generalmente se hereda como un rasgo autosómico dominante, que se asocia con un incremento del riesgo de TEV. A su vez, existe un tipo de deficiencia homocigota severa (o heterocigota compuesta) mucho más rara que suele ser incompatible con la vida. Sin embargo, en algunos casos puede ser heredada como un rasgo autosómico recesivo (353) y puede dar lugar a la aparición tardía de los síntomas (354) o incluso a la ausencia de sintomatología (355).

Con el fin de realizar un compendio de los numerosos estudios realizados en torno a esta patología, Reitsma y col. (356) confeccionaron una base de datos con las mutaciones que causan deficiencia de proteína C. El listado recogía un total de 67 cambios de base diferentes, de los cuales 29 (43%) se producen en un dinucleótido CpG y son transiciones C a T o G a A compatibles con un modelo de desaminación mediado por metilación. En 1995 realizaron una actualización de la base de datos (357), la cual contiene 331 entradas que describen 160 mutaciones diferentes.

En la actualidad, hay descritas un total de 232 mutaciones en el gen que codifica para la proteína C: 169 sustituciones nucleotídicas con cambio de sentido o sin sentido, 21 sustituciones nucleotídicas que modifican los sitios de splicing, 11 sustituciones nucleotídicas que modifican secuencias reguladoras, 19 pequeñas deleciones, 9 pequeñas inserciones, 1 inserción-delección y 2 grandes deleciones. Del total de las

## **Mutaciones en el Sistema de la proteína C** \_\_\_\_\_

mutaciones descritas, 229 están asociadas con una deficiencia de proteína C (198 cambios nucleotídicos, 29 micro-lesiones y 2 grandes lesiones) y 3 están asociadas con una reducción de los niveles de proteína C (producidas por cambios nucleotídicos). Para mayor información, consultar los datos disponibles para el gen de la proteína C en la página web *Human Gene Mutation Database*.

(<http://uwcmml1s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120317.html>).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





## **2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO**

El sistema anticoagulante de la proteína C juega un papel esencial en la regulación de la formación de fibrina a través de la degradación proteolítica de los cofactores procoagulantes Va y VIIIa por la APC. La proteína C circula en plasma como zimógeno, el cual es activado por el complejo trombina-trombomodulina sobre la superficie de la célula endotelial. El EPCR, es capaz de unirse a la proteína C sobre la superficie endotelial potenciando su tasa de activación. La generación de APC depende del correcto ensamblaje sobre la superficie de las células endoteliales de, al menos, estas cuatro proteínas: trombina, trombomodulina, proteína C y EPCR.

Por lo tanto, nuestra primera hipótesis de trabajo fue que cualquier cambio que altere la expresión de estas proteínas o su correcto ensamblaje podría dar lugar a una reducción de la generación de APC. La segunda hipótesis que nos planteamos fue que, dada la función anticoagulante del sistema de la proteína C, una reducción de la generación de APC daría lugar a un incremento del riesgo de trombosis.

Durante los años previos al inicio de la presente Tesis Doctoral, se realizaron estudios que sugerían la asociación entre mutaciones en los genes que codifican para la trombomodulina, protrombina y proteína C, y la trombosis, tanto venosa como arterial. Sin embargo, al inicio de esta tesis doctoral no había sido descrita la existencia de mutaciones en el gen que codifica para el EPCR, por lo que la búsqueda de las mismas constituye uno de los principales objetivos de este estudio. Algunos de los estudios referidos anteriormente consistían en la descripción de un caso clínico o estudios familiares, y otros únicamente estudiaban la asociación entre mutación y enfermedad. Sin embargo, solamente aquellos estudios que describen una fuerte relación entre polimorfismos, fenotipo y efecto clínico, pueden sugerir firmemente que la variación genética contribuye a la enfermedad. Por otra parte, puesto que la trombomodulina y el EPCR son proteínas integrales de membrana, sus deficiencias son difíciles de investigar en términos de fenotipo. Aunque se ha caracterizado un pequeño número de mutaciones en términos de estudios de expresión y función, hay que destacar que no se ha realizado ningún estudio de asociación de mutaciones en estos genes con los niveles de APC, el producto final de la interacción entre trombina, trombomodulina, proteína C y EPCR. La determinación del nivel de APC circulante es esencial, puesto que la hipótesis es que una mutación en el gen de la trombomodulina y del EPCR que produzca una pérdida de función debe dar lugar a una generación de APC reducida.

### 2.2 OBJETIVOS

Como objetivos de la presente Tesis Doctoral se fijaron los siguientes:

1. - Evaluar si un nivel reducido de APC circulante constituye un factor de riesgo de trombosis venosa.
2. - Comprobar si los niveles reducidos de APC están genéticamente determinados.
3. - Desarrollar una nueva estrategia para la identificación de mutaciones en los genes que codifican para las cuatro proteínas del complejo de activación de la proteína C (trombina, trombomodulina, proteína C y EPCR), que puedan dar lugar a una alterada generación (aumentada o disminuida) de APC. Puesto que no se había descrito la existencia de mutaciones en el gen del EPCR al inicio de la tesis, la búsqueda de alteraciones en este gen constituyó un objetivo prioritario.
4. - Estudiar la asociación de las mutaciones identificadas en estos genes con los niveles de APC circulante, y el riesgo de trombosis.
5. - Determinar la influencia de las nuevas mutaciones encontradas sobre el riesgo de trombosis asociado a la presencia de la mutación factor V Leiden.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### **3.1 GRUPOS CLÍNICOS**

Todos los pacientes y controles dieron su consentimiento informado previo a la toma de muestras. El estudio fue aprobado por el Comité Ético local y la investigación fue llevada a cabo según los principios de la Declaración de Helsinki.

#### **3.1.1 ESTUDIO DE NIVELES REDUCIDOS DE APC CIRCULANTE COMO FACTOR DE RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA**

Para el estudio de los niveles reducidos de APC circulante como factor de riesgo de trombosis, se reclutó a pacientes que habían tenido al menos un episodio de TVP en los miembros inferiores, a partir del registro de pacientes remitidos al Hospital Universitario La Fe para realizar un estudio de trombofilia. La TVP en miembros inferiores se diagnosticó mediante ultrasonografía o venografía y el embolismo pulmonar se diagnosticó mediante scanning pulmonar por ventilación-perfusión o angiografía pulmonar.

Se excluyeron del estudio todos aquellos pacientes que estaban en tratamiento con anticoagulantes orales y aquellos que presentaban algún defecto trombofílico conocido, como son la deficiencia de antitrombina; deficiencia de proteína C (se considera un valor normal aquel superior al 65% del valor de proteína C obtenido para el pool de plasma); deficiencia de proteína S (se considera un valor normal aquel superior al 65% del valor de proteína S obtenido para el pool de plasma); deficiencia de plasminógeno; deficiencia de cofactor II de la heparina; resistencia a la proteína C activada; los que presentaran anticuerpos antifosfolípidos; así como aquellos con defectos genéticos identificados como factores de riesgo de trombosis, como son el factor V Leiden y el polimorfismo G20210A en el gen de la protrombina. A su vez, se excluyeron del estudio aquellos pacientes con las siguientes patologías: cáncer, síndrome nefrótico, disfunción renal o hepática, enfermedades inflamatorias o infecciosas, enfermedad coronaria o lupus anticoagulante.

Un total de 172 pacientes caucásicos satisfacían todos los criterios de inclusión y 160 de ellos, 85 mujeres y 75 hombres, accedieron a participar en el estudio. La edad media era de 41 años en el momento de la toma de muestra, 40 años para el grupo de las mujeres y 42 años para el grupo de los hombres. Veintitrés pacientes presentaban embolismo pulmonar, 29 pacientes presentaban historia de TEV recurrente, y 42 presentaban historia familiar de trombosis. En el grupo de pacientes se encontraron

## **Mutaciones en el Sistema de la proteína C**

---

factores de riesgo trombótico circunstanciales en el 66% de los casos, e incluían: factores médicos como anticonceptivos orales, venas varicosas y embarazo en el 41% de los casos; cirugía en el 20% de los casos; e inmovilización y trauma en el 16% de los casos.

Los individuos del grupo control fueron reclutados junto con el grupo de pacientes y eran 199 individuos voluntarios caucásicos no relacionados entre sí, de edad y sexo similar al de los pacientes (107 mujeres y 92 hombres), con una media de edad de 41 años (media de edad de hombres y mujeres 41 años) y de la misma región geográfica. Todos ellos estaban aparentemente sanos y ninguno presentaba historia personal o familiar de trombosis, lo cual fue verificado a través de un cuestionario validado (358). Se excluyeron del estudio aquellos individuos con algún defecto trombofílico conocido, como la deficiencia de antitrombina, proteína C, proteína S, plasminógeno o cofactor II de la heparina, así como aquellos con resistencia a la proteína C activada, presencia de la mutación factor V Leiden, presencia del polimorfismo G20210A en el gen de la protrombina o anticuerpos antifosfolípidos.

Con el fin de analizar la variación longitudinal del nivel de APC en un individuo, de los 57 pacientes que presentaron niveles APC inferior a 0,77 ng/ml en el estudio inicial, a 38 se les realizó una segunda toma de muestra varios meses después de la primera determinación. De los 15 pacientes que mostraron un nivel de APC superior a 0,77 ng/ml en la segunda visita, 11 fueron estudiados una tercera vez al menos un mes después de la segunda determinación.

Para evaluar la posible heredabilidad del fenotipo “bajo nivel de APC”, llevamos a cabo un reducido estudio familiar en ocho probandos con TEV y niveles de APC inferior a 0,77 ng/ml. Para ello, reclutamos al mayor número posible de familiares de estos probandos.

La toma de muestras comenzó en 1997 y se llevó a cabo al menos seis meses después del último episodio trombótico (rango: 6 – 48 meses; mediana: 11 meses). El tratamiento con anticoagulantes orales había finalizado al menos 30 días antes de la toma de muestras.

### **3.1.2 ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL EPCR A LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE EPCR SOLUBLE Y DE APC CIRCULANTE, Y AL RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA**

Para el estudio de la contribución de los polimorfismos presentes en el gen del EPCR a los niveles plasmáticos de sEPCR, a los niveles de APC circulante y al riesgo trombótico, se identificó en el registro de nuestro hospital a los pacientes con al menos un episodio de TVP en miembros inferiores y/o embolismo pulmonar, remitidos a nuestro Centro para un examen de trombofilia durante un periodo de 7 años. Todos los pacientes se diagnosticaron por procedimientos objetivos tras su admisión.

Se excluyeron del estudio todos aquellos pacientes que presentaban anticuerpos antifosfolípidos, así como aquellos con las siguientes patologías: cáncer, síndrome nefrótico, disfunción renal o hepática, enfermedades inflamatorias o infecciosas, enfermedad coronaria o lupus anticoagulante.

Un total de 480 pacientes caucásicos satisfacían todos los criterios de inclusión y 405 de ellos, 207 mujeres y 198 hombres, accedieron a participar en el estudio. La edad media era de 41 años en el momento de la toma de muestra, 40 años en el grupo de las mujeres y 42 años en el grupo de los hombres. Noventa y siete pacientes (24%) presentaban embolismo pulmonar, 85 pacientes (21%) presentaban historia de TEV recurrente, y 117 (29%) presentaban historia familiar de trombosis.

Como grupo control, se estudió un total de 401 individuos caucásicos no relacionados entre sí, de los cuales 202 eran mujeres y 199 eran hombres, con una media de edad de 40 años para el grupo de mujeres y 41 años para el grupo de hombres. Los controles se reclutaron entre el personal del Hospital Universitario La Fe. Todos estaban aparentemente sanos y ninguno de ellos presentaba historia personal o familiar de trombosis. Se excluyeron del estudio aquellos individuos con cáncer, síndrome nefrótico, disfunción renal o hepática, enfermedades inflamatorias o infecciosas, enfermedad coronaria o lupus anticoagulante.

### **3.1.3 GRUPO DE PACIENTES CON NIVELES DE APC REDUCIDOS**

Tras la determinación de los niveles de APC circulante en el grupo de pacientes con TEV y el grupo de controles, se seleccionaron aquellos pacientes con historia de



## **Mutaciones en el Sistema de la proteína C \_\_\_\_\_**

TEV que tenían los niveles más bajos de APC circulante, por debajo del percentil 10% del grupo control, de forma persistente.

A este grupo de 26 pacientes con historia de TEV que tenían bajos niveles de APC, se les realizó un estudio genético consistente en el análisis por secuenciación de la región codificante y parte de la región no codificante de los genes del EPCR, trombomodulina, proteína C y protrombina.

### **3.1.4 INDIVIDUOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN FACTOR V LEIDEN**

Con el fin de analizar si la presencia de alguna de las nuevas mutaciones encontradas modifica el riesgo trombótico, ya incrementado, que presentan los individuos portadores de la mutación factor V Leiden, se estudió un total de 218 individuos portadores de la mutación factor V Leiden. Este grupo estaba formado por 76 pacientes no relacionados entre sí con historia de TVP en miembros inferiores, con una media de edad de 42 años (rango, 18-75), y por 142 familiares de estos pacientes, también portadores de la mutación factor V Leiden pero asintomáticos, con una media de edad de 38 años (rango, 17-89 años).

### **3.2 MUESTRAS BIOLÓGICAS**

Las muestras biológicas requeridas para los diferentes estudios que se realizaron a los pacientes y controles se obtuvieron a partir de sangre periférica, la cual fue tratada de diferente forma en función de los requerimientos de cada uno de los ensayos.

Las muestras de sangre fueron tomadas entre las 8 y las 10 de la mañana tras un ayuno de 8 a 10 horas. La extracción de sangre se realizó por punción de la vena cubital de forma no traumática, utilizando jeringuillas de calibre 21. En aquellos casos en que fue necesaria una adecuada exposición de la vena, se aplicó un torniquete durante un máximo de 60 segundos.

Las muestras de sangre se recogieron en Vacutainers® siliconados (Becton Dickinson) que contenían diferentes tipos de anticoagulantes en función de la técnica para la que estaban destinadas.

### **3.2.1 MUESTRAS PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA**

Las muestras de sangre para la extracción del DNA fueron anticoaguladas con EDTA. Tras la extracción, las muestras que no se procesaron inmediatamente se distribuyeron en alícuotas adecuadas para su posterior procesado y almacenadas a -80°C.

### **3.2.2 MUESTRAS PARA LAS DETERMINACIONES PROTEICAS**

Para la determinación de los niveles plasmáticos de proteína C, PCI y  $\alpha_1$ AT, la sangre fue anticoagulada con 0,5 ml de citrato trisódico 0,129 M. La sangre citratada se centrifugó a 2000 x g durante 30 minutos a 4°C y los plasmas obtenidos se distribuyeron en pequeñas alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

### **3.2.3 MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA C ACTIVADA**

Tras descartar los primeros 4,5 ml de sangre, se recogieron 4,5 ml de sangre en dos tubos que contenían 0,5 ml de citrato trisódico 0,129 M. Inmediatamente después de la extracción (en los 10 segundos posteriores), a uno de los tubos se añadió 46  $\mu$ l de heparina 1000 U/ml (Roger) y la mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C para forzar a toda la APC circulante a formar complejos con su principal inhibidor en plasma, el PCI. En presencia de heparina, más del 95% de la APC forma complejos con el PCI (359). Por tanto, la concentración APC:PCI en este tubo con heparina es la suma de la concentración de complejos APC:PCI circulantes *in vivo* y los complejos formados *in vitro* a partir de la APC circulante.

El segundo tubo de sangre fue inmediatamente mezclado (en los 10 segundos posteriores a la extracción) con 46  $\mu$ l de una mezcla formada por benzamidina-HCl 0,58 M (Sigma Chemical Co.) y PPACK 0,5 mM (Calbiochem) para bloquear la APC circulante y así evitar la formación de complejos entre la APC circulante y sus inhibidores plasmáticos. De manera que la concentración de complejos APC:PCI en este tubo refleja la concentración de complejos circulantes *in vivo*. Por tanto, la concentración de APC circulante se calcula a partir de la diferencia en la concentración de complejos APC:PCI de los dos tubos.

## **Mutaciones en el Sistema de la proteína C**

---

El plasma se obtuvo por centrifugación a 4°C durante 30 minutos a 2000 x g y fue almacenado en pequeñas alícuotas a -80°C.

### **3.3 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Y ANTICUERPOS**

La purificación del PCI a partir del plasma se realizó siguiendo métodos previamente descritos (360). Brevemente, este protocolo consta de una primera etapa de precipitación selectiva con cloruro de bario, dos etapas sucesivas de precipitación selectiva con polietilenglicol 6000, y una etapa de cromatografía de intercambio iónico con DEAE-Sepharosa seguida de precipitación con sulfato amónico saturado al 40% y al 68%. A continuación, el precipitado obtenido se resuspendió, se aplicó a una columna de heparina-Sepharosa y las fracciones que contenían PCI se cromatografiaron en DEAE-Sepharcel. Se utilizó una columna de heparina-Sepharosa de 16 ml de lecho para concentrar el PCI contenido en las distintas fracciones cromatográficas. El PCI se detectó en todas las etapas de purificación mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA).

El anticuerpo policlonal anti-PCI y su fracción IgG se obtuvieron a partir de conejos siguiendo la metodología descrita (361). Los conejos se inmunizaron con una suspensión de PCI purificado y coadyuvante de Freund. Tras las sangrías, se aisló la fracción globulínica del suero por precipitación con sulfato amónico y, finalmente, la IgG anti-PCI se inmunopurificó en una columna de PCI-Sepharosa.

La proteína C se purificó siguiendo el método descrito previamente (362).

La APC se preparó a partir de proteína C purificada mediante activación con trombina siguiendo el método descrito previamente (363).

Los plasmas inmunodeficientes en PCI o proteína C se prepararon pasando plasma humano normal a través de una columna de Sepharosa 4B activada con CNBr a la que se unió IgG anti-PCI o IgG anti-proteína C, siguiendo los métodos descritos previamente (361). Mediante ELISAs específicos se pudo determinar que los plasmas inmunodeficientes conservaron menos del 0,1% de antígeno PCI o proteína C. El plasma inmunodeficiente en proteína C retuvo el 92% de la actividad del PCI presente en plasma normal.

El anticuerpo monoclonal anti-proteína C (C3) utilizado en el ELISA para medir los complejos APC:inhibidor, es un anticuerpo contra la cadena ligera de la proteína C, el cual fue cedido por el Dr JH Griffin (Research Institute of Scripps Clinic, La Jolla, CA, USA).

La conjugación de los anticuerpos con peroxidasa se llevó a cabo con una ligera modificación del procedimiento de dos pasos con glutaraldehído descrito por Avrameas y Terninck (364), según la técnica descrita previamente (361). Brevemente, la peroxidasa fue disuelta en glutaraldehído al 1,25% en tampón fosfato y en oscuridad durante toda la noche, a temperatura ambiente. Tras su diálisis frente a tampón carbonato, fue conjugada al anticuerpo durante toda la noche, a temperatura ambiente. Finalmente, los grupos reactivos remanentes se bloquearon con L-Lys 0,2 M, y el anticuerpo se guardó en pequeñas alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **3.4 TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS**

La determinación de los niveles de las diferentes proteínas estudiadas, se llevó a cabo mediante técnicas de ELISA tipo “sándwich”, o de doble anticuerpo.

El esquema de este tipo de ELISA es el siguiente:

- 1. - Reacción inmunológica:** los pocillos de la microplaca se incuban con un exceso del anticuerpo de captura, generalmente un anticuerpo monoclonal o policlonal específico contra la proteína a valorar. Tras bloquear los sitios de unión remanentes, se añade a la microplaca la muestra problema, convenientemente diluida, para lograr la unión al anticuerpo de captura del antígeno a valorar presente en la muestra. Tras el lavado de la placa, se incuba con un exceso de un segundo anticuerpo, el anticuerpo de detección, conjugado con un enzima, en este caso la peroxidasa. El anticuerpo de detección se une al antígeno inmovilizado y forma un “sándwich” anticuerpo – antígeno – anticuerpo + enzima. La cantidad de enzima unido al pocillo es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra.
- 2. - Reacción enzimática y cuantificación:** a continuación, se lava la microplaca para separar el exceso de anticuerpo conjugado que no se ha unido, y se añade un sustrato sobre el cual actuará el enzima dando un producto coloreado. La absorción a una determinada longitud de onda, medida espectrofotométricamente, será proporcional a la concentración de antígeno presente en la muestra. Paralelamente, en cada placa se incluye una serie de diluciones obtenidas a partir de una solución de

antígeno a valorar de concentración conocida, para poder construir una curva de calibración.

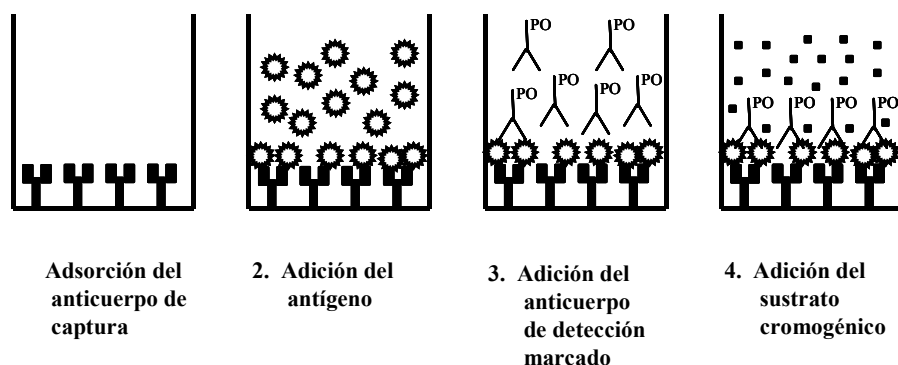


Figura 3.1. Esquema del desarrollo de la técnica de ELISA tipo "sándwich".

### 3.4.1 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA C ACTIVADA CIRCULANTE

Los niveles de APC circulante se determinaron siguiendo el método descrito previamente (115, 365), con algunas modificaciones (366), basado en un ensayo tipo ELISA para la detección de la APC acomplejada con su principal inhibidor en plasma, el PCI, en muestras duplicadas.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1. - Adsorción del anticuerpo de captura a la placa.** La placa de poliestireno Maxisorp F96 (NUNC) se recubrió, al menos, durante una noche a 4°C en atmósfera húmeda, con 50 µl/pocillo de una solución de anticuerpo monoclonal anti-proteína C (C3) en tampón de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M, 0,02% azida sódica, pH 9,6).
- 2. - Lavado.** La placa se lavó tres veces con 250 µl/pocillo de tampón bloqueo (Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,14 M, 0,04% azida sódica, 0,02% Tween 20, 1% caseína, pH 7,4).
- 3. - Bloqueo.** La superficie libre restante de los pocillos se bloqueó por incubación con tampón bloqueo durante 1 hora a 37°C.
- 4. - Lavados.** La placa se lavó dos veces como se ha descrito anteriormente.

5. - **Incubación de las muestras.** Se añadió a cada pocillo 50 µl de la muestra convenientemente diluida en tampón bloqueo (habitualmente 1/6), y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente, en agitación.
6. - **Lavados.** La placa se lavó tres veces con tampón bloqueo, seguido de tres lavados con tampón conjugado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M, NaCl 0,14 M, 0,05% timerosal, 0,05% Tween 20, 0,1% seroalbúmina bovina, pH 7,4).
7. - **Incubación con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa.** A cada pocillo de la placa se le añadió 50 µl del anticuerpo de detección, un anticuerpo policlonal anti-PCI diluido en tampón conjugado, y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente, en agitación.
8. - **Lavados.** La placa se lavó seis veces con tampón conjugado.
9. - **Revelado.** El revelado se realizó utilizando, como sustrato de la enzima peroxidasa, o-fenilendiamina (OPD; Sigma Chemical Co.). Para ello, se añadió 50 µl/pocillo de una solución de citrato sódico 0,1 M, fosfato sódico 0,2 M, pH 5,0, a la que en el momento de su uso se le añadió 0,4 mg/ml de OPD y 0,4 µl/ml de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El desarrollo de color se llevó a cabo a temperatura ambiente, parándose la reacción a los 30 minutos por adición de 40 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4M. Finalmente, se realizó la lectura de la absorbancia a 492 nm en un lector de placas de ELISA (*EASY Reader EAR 400 AT*, SLT-Labinstruments).

La curva de calibración se construyó con los valores de absorbancia producidos por cantidades conocidas de complejos APC:PCI preformados *in vitro*, la cual sirvió para calcular la concentración de APC en las muestras problema.

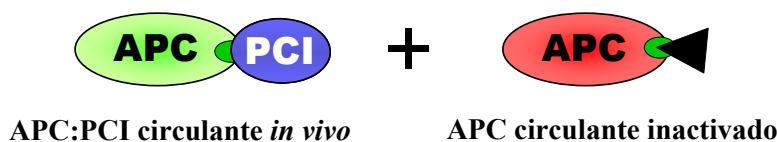
Así, en el ELISA para el ensayo de la APC, cada placa contiene muestras de plasma con heparina por duplicado y plasma con inhibidores por duplicado de cada paciente, lo cual permite medir los niveles de APC de 20 pacientes diferentes en aproximadamente 4 horas. La determinación de la APC se llevó a cabo dentro de los seis meses posteriores a la toma de muestra.

El límite de detección del ensayo de APC es 0,1 ng/ml. Las variaciones intra- e inter-ensayo eran inferiores al 6 y 11%, respectivamente.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C \_\_\_\_\_

Aunque nuestro ensayo de APC consiste en un ELISA que mide los complejos APC:PCI antes y después de la adición de heparina, realmente determina la actividad proteolítica de la APC para cortar y acomplejarse al PCI, puesto que la APC no funcional e inactiva no cortará y se acomplejará al PCI.

### Tubo de benzamidina + PPACK



### Tubo de heparina

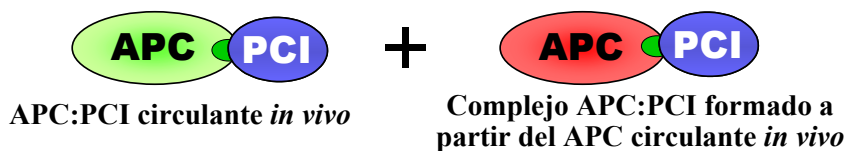


Figura 3.2. Esquema del fundamento del método de cuantificación de la APC circulante.

### 3.4.1.1 Estudio de la influencia del nivel de proteína C o PCI en el ensayo de APC

Para estudiar la influencia del nivel plasmático de proteína C o PCI en el ensayo de la APC, se incubaron 100  $\mu$ l de plasma citratado deficiente en proteína C o deficiente en PCI durante 10 minutos a 37°C con 5  $\mu$ l de proteína C purificada o PCI purificado, respectivamente, hasta alcanzar una concentración final entre 0,25 y 8  $\mu$ g/ml (lo cual representa del 6,25% al 200% de la concentración de estas proteínas en el plasma humano normal). Seguidamente las muestras se incubaron durante 30 minutos con 5  $\mu$ l de APC en tampón A (Tris-HCl 0,05 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, 1% seroalbúmina bovina y 0,02% azida sódica), hasta alcanzar una concentración final de APC de 1, 20 o 100 ng/ml en presencia de 10 U/ml de heparina. Finalmente se midieron los complejos APC:PCI.

### **3.4.1.2 Estudio de la influencia de los niveles de $\alpha_1$ AT en el ensayo de APC**

Puesto que la  $\alpha_1$ AT es una proteína reactante de fase aguda y su concentración puede elevarse considerablemente durante los procesos inflamatorios asociados a la trombosis, quisimos determinar si las variaciones en el nivel plasmático de  $\alpha_1$ AT pueden afectar al ensayo de APC. Para ello, se añadieron a 50  $\mu$ l de plasma humano normal, 50  $\mu$ l de varias concentraciones de  $\alpha_1$ AT purificada (2,5, 5 o 7,5 mg/ml en tampón A) o 50  $\mu$ l de tampón, y la mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos. Seguidamente se añadió una mezcla formada por 10  $\mu$ l de APC en tampón A conteniendo 90 U/ml de heparina hasta alcanzar una concentración final de APC de 1, 20 o 100 ng/ml, y se midió la concentración del complejo APC:PCI en las muestras de incubación.

### **3.4.1.3 Estudio de la recuperación de APC extrínseca en plasma**

Para estudiar la recuperación de la APC extrínseca añadida al plasma, mediante el ensayo de la APC, se añadieron 2  $\mu$ l de varias concentraciones de APC purificada (7,8, 15,6 y 23,4  $\mu$ g/ml) o tampón, a 50  $\mu$ l de plasma con heparina o plasma con inhibidores de 30 pacientes con TEV que tenían niveles de APC por debajo de 0,77 ng/ml. Tras la incubación durante 30 minutos a 37°C, se midieron los complejos APC:PCI. La recuperación de APC se calculó restando la concentración de APC obtenida tras la adición de tampón, del nivel de APC medido tras la adición de APC extrínseca, y el valor fue expresado como porcentaje de la APC añadida.

### **3.4.1.4 Estudio del bloqueo de la formación de complejos *in vitro* por el cóctel de inhibidores**

Para valorar si el cóctel de inhibidores utilizado durante la extracción de muestras sanguíneas para la determinación de APC circulante (benzamidina y PPACK) bloquea de forma efectiva la formación de complejos *in vitro*, se recolectaron muestras de sangre de dos donantes en tubos con citrato que contenían el cóctel de inhibidores y la mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C con un volumen 1/100 de una solución de APC hasta alcanzar la concentración final de APC en sangre de 1, 20 y 100 ng/ml, en presencia de 10 U/ml de heparina. Seguidamente se midieron los complejos APC:PCI.



### **3.4.2 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA C ANTIGÉNICA**

Los niveles de proteína C antigénica se determinaron mediante un ensayo tipo ELISA descrito previamente (367). Brevemente, como anticuerpo de captura se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-proteína C (C3), y como anticuerpo de detección se utilizó la fracción IgG de un anticuerpo policlonal anti-proteína C conjugada con peroxidasa. La reacción se paró a los 25 minutos. La curva de calibración se preparó utilizando diluciones seriadas de plasma humano normal.

El límite de detección del ensayo es de 1 ng/ml de proteína C. Las variaciones intra- e inter-ensayo eran inferiores al 6 y 9%, respectivamente.

### **3.4.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES FUNCIONALES DE PCI**

La determinación del PCI funcional se llevó a cabo siguiendo el método previamente descrito (368), basado en la capacidad del PCI nativo para formar complejos con la APC. En presencia de heparina a una concentración final de 4 – 10 U/ml, la adición de un exceso de APC al plasma resulta en la formación de complejos entre todo el PCI plasmático activo y la APC añadida, mientras que el posible PCI degradado o acomplexado no reacciona con la APC. Por tanto, cuando a una muestra conteniendo PCI se le añade un exceso de APC purificada en presencia de heparina, la cantidad de complejos APC:PCI formados será proporcional (el doble en términos de concentración) a la concentración de PCI activo presente en la muestra. Brevemente, a una alícuota de las muestras se le añadió heparina y un exceso de APC, y la mezcla fue incubada durante 60 minutos a 37°C. A continuación, estas mezclas se diluyeron convenientemente en tampón bloqueo y se determinaron los complejos APC:PCI mediante el ensayo de ELISA tipo “sándwich” descrito anteriormente.

El límite de detección del ensayo es de 10 ng/ml de PCI. Las variaciones intra- e inter-ensayo eran inferiores al 8 y 12%, respectivamente.

#### **3.4.4 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE $\alpha_1$ AT**

La determinación inmunológica de la  $\alpha_1$ -antitripsina se llevó a cabo mediante un ELISA específico utilizando la fracción IgG de un antisuero de conejo anti- $\alpha_1$ AT (Calbiochem).

Las variaciones intra- e inter-ensayo eran inferiores al 8 y 10%, respectivamente.

#### **3.4.5 DETERMINACIÓN DE LOS FRAGMENTOS F1+2 DE LA PROTROMBINA**

Los fragmentos 1+2 de la protrombina (F1+2) se midieron utilizando el plasma obtenido a partir del tubo de sangre conteniendo benzamidina y PPACK, mediante el ELISA comercial *Enzignost F1+2 micro* (Dade-Behring).

Las variaciones intra- e inter-ensayo eran inferiores al 5 y 8%, respectivamente.

#### **3.4.6 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EPCR SOLUBLE**

Los niveles de sEPCR se determinaron mediante el ELISA comercial *Asserachrom sEPCR* (Diagnostica Stago) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las placas se recubrieron con un anticuerpo monoclonal anti-EPCR e incubadas durante 1 hora con muestras diluidas de plasmas y calibradores, y el sEPCR fue detectado con un segundo anticuerpo anti-EPCR marcado con peroxidasa.

Las variaciones intra- e inter-ensayo eran inferiores al 5 y 7%, respectivamente.

#### **3.4.7 OTRAS DETERMINACIONES**

La antitrombina funcional se determinó como actividad anti factor Xa en presencia de heparina, mediante un ensayo comercial (*Antithrombin kit*, Instrumentation Laboratory, Milán, Italia), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las variaciones intra- e inter-ensayo eran inferiores al 4%.

La proteína S funcional se determinó como el grado de prolongación del tiempo de protrombina en presencia de tromboplastina bovina, iones calcio y APC, empleando

un ensayo comercial (Instrumentation Laboratory, Milán, Italia). Las variaciones intra- e inter-ensayo eran inferiores al 7%.

La resistencia a la APC se determinó según el ensayo modificado (369), tras diluir el plasma de los pacientes con plasma deficiente en factor V. Las variaciones intra- e inter-ensayo eran inferiores al 5%.

### **3.5 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

#### **3.5.1 EXTRACCIÓN DE DNA**

Para la extracción de DNA se utilizó un ensayo comercial (*Wizard® Genomic DNA Purification Kit*, Promega, Innogenetics).

Este ensayo permite el aislamiento de DNA genómico de doble cadena a partir de diferentes tipos de muestras biológicas, más concretamente en nuestro caso a partir de los leucocitos de sangre periférica de los individuos estudiados. Este método de extracción aporta diversas ventajas frente a las técnicas clásicas, puesto que se realiza un aislamiento de forma rápida y precisa obteniendo al mismo tiempo un elevado rendimiento, todo ello sin emplear laboriosos pasos de extracción con solventes orgánicos o digestiones con proteinasas.

Este método de purificación de DNA se basa en un proceso de cuatro pasos (370). El primer paso en el proceso de purificación consiste en la lisis específica de los eritrocitos mediante una solución que deja intactos los leucocitos. En un segundo paso, los leucocitos y su núcleo son lisados y solubilizados. En este punto del proceso puede añadirse de forma opcional un paso de degradación de RNA mediante la incubación de las muestras con una RNasa en las condiciones óptimas para su actividad. Posteriormente se eliminan, por precipitación salina, las proteínas celulares presentes como consecuencia de la previa degradación de las estructuras celulares; de esta forma los restos celulares son concentrados en el fondo del tubo mientras que el DNA genómico de elevado peso molecular permanece intacto en solución. Finalmente, este DNA genómico es concentrado y desalado mediante una precipitación con isopropanol y, tras su lavado con etanol, es resuspendido en una solución tamponada para un adecuado uso o almacenamiento.

El DNA aislado puede ser almacenado a una temperatura de 2 a 8°C de manera estable aunque, como consecuencia del paso del tiempo, las muestras podrían sufrir una

degradación progresiva. Por ello, se recomienda su almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  en aquellos casos en los que las muestras no vayan a ser utilizadas de forma frecuente, preferiblemente en alícuotas de uso individual.

El rendimiento medio del proceso de extracción de DNA genómico humano con este ensayo, a partir de un volumen inicial de 300  $\mu\text{l}$  de sangre total, es de 5 a 15  $\mu\text{g}$  de DNA, aunque dependerá de la cantidad de leucocitos presentes en la muestra.

Para la obtención del máximo rendimiento en la extracción, la sangre debe ser recolectada en tubos con anticoagulante (indistintamente EDTA, heparina o citrato) para prevenir la coagulación de la muestra y la degradación del DNA. Se recomienda partir de sangre fresca almacenada a  $2-8^{\circ}\text{C}$  durante un corto periodo de tiempo o sangre congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  inmediatamente después de su extracción en alícuotas de volumen adecuado.

El DNA obtenido mediante este procedimiento puede ser empleado para gran variedad de aplicaciones posteriores como amplificación por PCR, digestión con enzimas de restricción o hibridación de DNA en membranas (Ej. *Southern blot*, *dot blot*, etc.).

Finalmente, es necesaria la utilización de material estéril y guantes durante todo el proceso para evitar la contaminación y degradación del DNA por las DNasas presentes en las superficies.

Todos los pasos de la extracción se realizan a temperatura ambiente.

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. - A un tubo estéril de 1,5 ml conteniendo 900  $\mu\text{l}$  de *Cell Lysis Solution*, se le añade una alícuota de 300  $\mu\text{l}$  de la muestra de sangre total homogeneizada, y se invierte varias veces para homogeneizar.
2. - Se incuba la mezcla durante 10 minutos en un agitador orbital con el fin de lisar los eritrocitos. Posteriormente se centrifuga durante 20 segundos a 13000-16000 x g.
3. - Se elimina la mayor cantidad de sobrenadante posible dejando el pellet de leucocitos. En aquellos casos en los que el pellet parezca contener glóbulos rojos residuales o la muestra de partida haya estado congelada durante un largo periodo de tiempo, se recomienda repetir los pasos 1 – 3 para una máxima degradación de los eritrocitos que, de otra forma, podrían interferir negativamente en los pasos subsiguientes.

4. - Se resuspenden completamente los leucocitos agitando vigorosamente la muestra durante 10 – 15 segundos.
5. - Para disgregar los leucocitos, se añade 300 µl de *Nuclei Lysis Solution* y se pipetea la mezcla varias veces para favorecer la lisis. La solución se vuelve viscosa, y se recomienda incubarla durante 1 hora a 37°C hasta que los grumos hayan desaparecido. Si no fuera así, podría añadirse de nuevo 100 µl de la solución de lisis y repetir la incubación.
6. - Llegados a este punto del procedimiento se puede realizar, de manera opcional, una degradación del RNA presente en la muestra con 1,5 µl de RNasa A 4 mg/ml (Promega, Innogenetics) incubándola durante 15 minutos a 37°C tras mezclar cuidadosamente. Antes de proseguir con el siguiente paso, debe atemperarse la muestra.
7. - Para purificar el lisado nuclear deben precipitarse las proteínas que conforman los restos celulares, lo cual se lleva a cabo añadiendo 100 µl de *Protein Precipitation Solution* y agitando vigorosamente la mezcla durante 20 segundos hasta obtener grumos de proteínas en la solución.
8. - Para separar la solución que contiene el DNA de los restos celulares, se centrifuga la muestra durante 3 minutos a 13000 – 16000 x g.
9. - Se recupera el sobrenadante y se transfiere a un tubo de 1,5 ml estéril. Es fundamental recuperar la mayor parte de sobrenadante posible, aunque un pequeño volumen debe quedar remanente junto con el pellet de proteínas con el fin de evitar la contaminación de la solución de DNA con estas proteínas que interferirían en su purificación.
10. - Al tubo conteniendo el DNA se le añade 300 µl de isopropanol de grado molecular para favorecer la precipitación del DNA. Para precipitar el DNA, se incuba la muestra en un agitador orbital durante 2 minutos o hasta hacerse visible la madeja de DNA.
11. - La muestra se centrifuga durante 1 minuto a 13000 – 16000 x g para recuperar el DNA en forma de un pequeño pellet blanco.
12. - Puesto que el pellet de DNA es extremadamente lábil, debe prestarse un especial cuidado a la hora de eliminar el sobrenadante lo cual puede realizarse por decantación o por aspiración con una pipeta Pasteur capilar. Seguidamente, se añaden 300 µl de etanol 70% y se invierte con cuidado para lavar el precipitado y las paredes del tubo. Seguidamente, se centrifuga la muestra durante 1 minuto a 13000 – 16000 x g.

13. -Se elimina con mucho cuidado el sobrenadante y se seca el DNA durante 10 – 15 minutos a temperatura ambiente colocando el tubo invertido sobre un papel secante o por aspiración en el *SpeedVac*.
14. -La muestra de DNA es resuspendida con 100 µl de *DNA Rehydration Solution* (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) durante toda la noche a temperatura ambiente o a 4°C. Alternativamente puede incubarse la muestra 1 hora a 65°C, durante la cual se recomienda agitar la solución periódicamente.

La muestra de DNA resuspendido puede almacenarse a 2 – 8°C hasta su utilización, o bien congelar a –20°C.

### **3.5.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento específico de DNA situado entre dos oligonucleótidos que sirven como cebadores para una serie de reacciones de síntesis catalizadas por la polimerasa de DNA (371).

El DNA molde es desnaturalizado a elevadas temperaturas y, en presencia de una polimerasa de DNA y un exceso de dNTPs, los oligonucleótidos que hibridan específicamente a la región de DNA molde complementaria, permiten la síntesis exponencial de nuevas cadenas de DNA a lo largo de las sucesivas rondas de amplificación, puesto que los productos obtenidos tras una ronda de amplificación sirven a su vez como molde para la siguiente. Así, tras cada ciclo sucesivo se duplica la cantidad del producto deseado.

El protocolo original de la PCR fue inicialmente descrito por Saiki y col. (372), Mullis y col. (373) y Mullis y Faloona (374) en el cual utilizaban el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* para catalizar la extensión de los cebadores. Puesto que este enzima es inactivado a las elevadas temperaturas requeridas para la desnaturalización del DNA, Saiki y col. (375) introdujeron una DNA polimerasa termoestable purificada a partir de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerasa) (376).

Un programa típico de PCR consta de los siguientes pasos (377):

1. - **Desnaturalización inicial:** mediante la incubación de la muestra a elevada temperatura se separan las dobles cadenas de DNA para poder ser copiadas. Suele realizarse a 94°C durante 3 minutos, aunque puede incrementarse hasta 96°C e incluso hasta 5 minutos en moldes ricos en GCs o con alto grado de estructura secundaria, si bien hay que tener en cuenta que la Taq polimerasa expuesta a elevadas temperaturas durante intervalos prolongados pierde su actividad.
2. - Un número de ciclos de PCR constituidos por las siguientes etapas:
  - 2.1- **Desnaturalización:** incubación a aproximadamente 95°C durante 30 segundos a 1 minuto, para permitir la separación de las dobles cadenas de DNA.
  - 2.2- **Hibridación:** al disminuir la temperatura de la mezcla de reacción, se permite que los cebadores hibriden con su secuencia homóloga del DNA molde para la posterior elongación de los fragmentos. La temperatura de hibridación determina si las condiciones de la amplificación son permisivas (baja temperatura de hibridación) o restrictivas (alta temperatura de hibridación) condicionando la especificidad y el rendimiento de la PCR, puesto que los cebadores pueden hibridar a secuencias no complementarias dando lugar a la síntesis de fragmentos no específicos cuya producción compite con la de los productos específicos, reduciendo el rendimiento final de la PCR. Esta temperatura debe establecerse empíricamente para cada ensayo. El paso de hibridación de cada ciclo suele durar de 30 segundos a 1 minuto.
  - 2.3- **Extensión:** se aumenta la temperatura de la muestra para permitir que la Taq polimerasa copie la secuencia del DNA molde incorporando detrás de los cebadores hibridados sobre el DNA los nucleótidos adecuados disponibles en forma de dNTPs, generando así nuevos fragmentos. Por las características de la Taq polimerasa, la duración óptima de la extensión de cada ciclo suele ser de 1 minuto a 72°C, pero para fragmentos de PCR más largos de 1 kb debe emplearse un tiempo de extensión de ~1 minuto/kb de DNA. Esto es debido a que el número de fragmentos que se obtienen en la PCR es exponencial: el número final de copias del fragmento deseado es de  $2^n$ ,

siendo  $n$  el número de ciclos. Hacia el final de la PCR la actividad de la Taq se va extinguiendo y la disponibilidad de dNTPs y de cebadores es menor. Por ello, la extensión de tal cantidad de fragmentos costará proporcionalmente mucho más que en los ciclos iniciales. Por ello se recomienda realizar la extensión durante un periodo de tiempo más prolongado e incluso realizar un paso de extensión final.

3. - **Extensión final:** este paso es opcional y suele realizarse a 72°C durante 4 – 10 minutos para permitir que todos los fragmentos que se están generando puedan ser copiados completamente. Aunque hay que tener en cuenta que una extensión excesivamente prolongada puede dar lugar a la obtención de bandas inespecíficas de mayor peso molecular a la banda esperada.

### 3.5.2.1 Diseño de cebadores para la amplificación del DNA

El correcto diseño de las parejas de cebadores utilizadas para la amplificación de un fragmento de DNA genómico por PCR constituye un punto esencial para la obtención de un producto altamente específico.

En su diseño, se recomienda que los cebadores empleados cumplan las siguientes características:

- Que su longitud sea de 18 a 30 nucleótidos
- Que tenga un contenido en GCs del 40 al 60%
- Se recomienda que la temperatura de *melting* ( $T_m$ ) de ambos sea similar. Existen diferentes fórmulas y páginas web disponibles para el cálculo de la  $T_m$  y otras propiedades de los cebadores, pero una fórmula sencilla es:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times (A+T) + 4^\circ\text{C} \times (G+C)$$

- Evitar la complementariedad de secuencia de 2 o 3 bases en el extremo 3' de la pareja de cebadores para reducir la formación de homodímeros o heterodímeros.
- Evitar la presencia de 3 o más Gs o Cs en el extremo 3' del cebador, ya que forman uniones demasiado estables con su base complementaria y, si



## Mutaciones en el Sistema de la proteína C \_\_\_\_\_

hibridan con una secuencia inespecífica, serán muy difíciles de desnaturalizar.

- Evitar una T al final del cebador. Los cebadores que terminan en T en el extremo 3' tienen una gran tolerancia para realizar apareamientos erróneos o *mismatches*.
- Evitar que haya secuencias complementarias dentro de la secuencia de un cebador y entre las parejas de cebadores, ya que se formarían lazos.
- Evitar la presencia de más de 5 nucleótidos idénticos seguidos.

La mayoría de cebadores empleados en nuestro estudio fueron diseñados utilizando el programa informático **Oligo 4.0** y sus características de secuencia y compatibilidad se analizaron con los programas **Oligo Calculator** (<http://micro.nwfsc.noaa.gov/protocols/oligoTMcalc.html>) y **Oligo Properties Calculator** (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>).

Tras diseñar unos cebadores, es importante realizar una búsqueda en todas las bases de datos de secuencias disponibles en la web mediante el programa **BLAST** (378, 379) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) comparando la secuencia de cada cebador por separado, para comprobar que no presenta homología importante con ninguna otra región del genoma humano y evitar la amplificación de regiones no deseadas.

La especificidad de los cebadores se comprobó tras la obtención por PCR de una única banda de DNA amplificado de tamaño adecuado en gel de agarosa y mediante secuenciación del fragmento amplificado.

Los cebadores empleados para la amplificación de los diferentes exones de los 4 genes estudiados: EPCR, trombomodulina, proteína C y protrombina, se situaron en las regiones intrónicas flanqueantes para así asegurar el análisis de la totalidad de la región codificante de los genes y las regiones reguladoras del *splicing* de cada uno de los intrones. Los cebadores se sintetizaron por Gibco-BRL (Invitrogen) o QUIAGEN Operon.

Las *Tablas 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4* muestran las características más importantes de cada pareja de cebadores utilizadas para la amplificación de los genes del EPCR, trombomodulina, protrombina y proteína C, respectivamente. En el encabezado de cada tabla se indica el trabajo tomado como referencia para la numeración de la secuencia. El cebador de cada par utilizado preferentemente en las reacciones de secuenciación viene indicado como **SEQ**.

**Tabla 3.1. Características de los cebadores utilizados para el estudio del gen del EPCR.** Numeración respecto al primer nucleótido (+1) del codón de inicio de la traducción (Met) (290).

PCR (EXÓN AMPLIFICADO)	SECUENCIA CEBADORES 5'→3'	POSICIÓN	% GC	T <sub>m</sub>
<b>EPCR1</b> (exón 1)	<b>EPCR1-F:</b> 5'-AGA CTC CGC CCC TCC CAG AC-3' <i>SEQ</i>	-110 – -91	70%	60°C
	<b>EPCR1-R:</b> 5'-CTG CAG ACA CAG ATG CTG TG-3'	180 – 161	55%	54°C
<b>EPCR2N</b> (exón 2)	<b>EPCR2N-F:</b> 5'-GAG TTA CTG TCA GCG TCA-3' <i>SEQ</i>	2385 – 2402	50%	48°C
	<b>EPCR2N-R:</b> 5'-CCC AGC AAT CTT CAA AGG-3'	2958 – 2941	50%	48°C
<b>EPCR3</b> (exón 3)	<b>EPCR3-F:</b> 5'-CCT CAC AGC ACT GAC TCT TG-3' <i>SEQ</i>	3907 – 3926	55%	54°C
	<b>EPCR3-R:</b> 5'-GGT CCA TCC ATT TGT CTG GA-3'	4362 – 4343	50%	52°C
<b>EPCR4</b> (exón 4)	<b>EPCR4-F:</b> 5'-GCT TCA GTC AGT TGG TAA AC-3' <i>SEQ</i>	4427 – 4446	45%	50°C
	<b>EPCR4-R:</b> 5'-TCT GGC TTC ACA GTG AGC TG-3'	4740 – 4721	55%	54°C

**Tabla 3.2. Características de los cebadores utilizados para el estudio del gen de la trombomodulina.** Numeración respecto al primer nucleótido (+1) del codón de inicio de la traducción (Met) (380).

PCR (EXÓN AMPLIFICADO)	SECUENCIA <i>CEBADORES</i> 5'→3'	POSICIÓN	% GC	T <sub>m</sub>
TMB	TMB-F (TM4): 5'-ACG ACT GCT TCG CGC TCT AC-3' <i>SEQ</i>	98 – 117	60%	56°C
	TMB-R (TM5): 5'-TCT CCC GTA ACC CAC TGG AA-3'	341 – 322	55%	54°C
TMC	TMC-F (TM10): 5'-CTG GAT CGG CCT GCA GCT GC-3'	258 – 277	70%	60°C
	TMC-R (TM11): 5'-AGG TGG CTG GGA AGT GGA AC-3' <i>SEQ</i>	523 – 504	60%	56°C
TMD	TMD-F (TM12): 5'-AGC CGA TCT GGG AGG AGC AG-3' <i>SEQ</i>	449 – 468	65%	58°C
	TMD-R (TM13): 5'-TCC CTG GCC CAG TGC CCC TG-3'	713 – 694	75%	62°C
TME	TME-F (TM6): 5'-CGG CTT ACA GCT AAT GTG CA-3'	654 – 673	50%	52°C
	TME-R (TM7): 5'-AGG TCG TTG CAG GAC TGC GT-3' <i>SEQ</i>	872 – 853	60%	56°C
TMF	TMF-F (TM14): 5'-CTG CAG GCA GAC GGG CGC TC-3' <i>SEQ</i>	817 – 836	75%	62°C
	TMF-R (TM15): 5'-TCC ACA CAC TCG CCG TCC AC-3'	1091 – 1072	65%	58°C
TMG	TMG-F (TM16): 5'-GTG GCT TCG AGT GCC ACT GC-3' <i>SEQ</i>	1034 – 1053	65%	58°C
	TMG-R (TM20): 5'-CAC AGC TAG CCT GGG TGT TG-3'	1276 – 1257	60%	56°C
TMH	TMH-F (TM21): 5'-CAG GTG CCA GAT GTT TTG CA-3'	1206 – 1225	50%	52°C
	TMH-R (TM22): 5'-GAG TCA CAG TCG GTG CCA AT-3' <i>SEQ</i>	1445 – 1426	55%	54°C
TMI	TMI-F (TM23): 5'-CGG TAC CTT CGA GTG CAT CT-3'	1377 – 1396	55%	54°C
	TMI-R (TM24): 5'-ACG GCC GGA GGA GTC AAG GT-3' <i>SEQ</i>	1529 – 1511	65%	58°C
TMI-ST	TMI-F (TM23): 5'-CGG TAC CTT CGA GTG CAT CT-3'	1377 – 1396	55%	54°C
	TMI-R (TM24): 5'-ACG GCC GGA GGA GTC AAG GT-3' <i>SEQ</i>	1529 – 1511	65%	58°C
TMI-1	TMH-F (TM21): 5'-CAG GTG CCA GAT GTT TTG CA-3'	1206 – 1225	50%	52°C
	TMJ-R (TM19): 5'-TGG ACG GAG CCA GGC TCC TG-3' <i>SEQ</i>	1760 – 1741	70%	60°C
TMI-2	TMI-F (TM23): 5'-CGG TAC CTT CGA GTG CAT CT-3'	1377 – 1396	55%	54°C
	TMJ-R (TM19): 5'-TGG ACG GAG CCA GGC TCC TG-3' <i>SEQ</i>	1760 – 1741	70%	60°C
TMI-3	TMG-F (TM16): 5'-GTG GCT TCG AGT GCC ACT GC-3' <i>SEQ</i>	1034 – 1053	65%	58°C
	THRMOD2LEIDEN-R: 5'-CGC ACT TGT ACT CCA TCT TGG CCC TG-3'	1663 – 1638	58%	63°C
TMJ	TMJ-F (TM25): 5'-CGA CAG CGG CTC TGG CGA GC-3' <i>SEQ</i>	1464 – 1483	75%	62°C
	TMJ-R (TM19): 5'-TGG ACG GAG CCA GGC TCC TG-3'	1760 – 1741	70%	60°C

**Tabla 3.3. Características de los cebadores utilizados para el estudio del gen de la protrombina.** Numeración respecto al primer nucleótido (+1) del codón de inicio de la traducción (Met) (313). El cebador PT14-R tiene una base mutada para generar un sitio de restricción que permita el análisis de restricción, marcada con fondo azul.

PCR (EXÓN AMPLIFICADO)	SECUENCIA CEBADORES 5'→3'	POSICIÓN	% GC	T <sub>m</sub>
PT1 (exón 1)	PT1-F: 5'-GAA CTT ACG ATA TTC CAT GG-3' <i>SEQ</i>	-438 – -419	40%	48°C
	PT1-R: 5'-TGC TCT GTC CAG CCA GGA GA-3'	162 – 143	60%	56°C
PT1-ST (exón 1)	PT1-F: 5'-GAA CTT ACG ATA TTC CAT GG-3' <i>SEQ</i>	-438 – -419	40%	48°C
	PT1-R: 5'-TGC TCT GTC CAG CCA GGA GA-3'	162 – 143	60%	56°C
PT2 (exón 2)	PT2-F: 5'-GGC TGC TTC TCT CTT CCA ATA TAG G-3' <i>SEQ</i>	246 – 270	48%	58°C
	PT2-R: 5'-GGA GTT CCT CCA ACA CAC ACA CCG-3'	1106 – 1083	58%	61°C
PT34 (exones 3 y 4)	PT3-4-F: 5'-CGG TGT GTG TGT TGG AGG AAC TCC-3' <i>SEQ</i>	1083 – 1106	58%	61°C
	PT3-4-R: 5'-CAA TGT CAG ATG CTG GGG ACT-3'	1722 – 1702	52%	54°C
PT56 (exones 5 y 6)	PT5-6-F: 5'-TTC AGG ATT GTG GAC CTG CA-3'	3820 – 3839	50%	52°C
	PT5-6-R: 5'-ATT ACG GGC ATG AGC CAC TG-3'	4386 – 4367	55%	54°C
PT56-ST (exones 5 y 6)	PT5-6-F: 5'-TTC AGG ATT GTG GAC CTG CA-3' <i>SEQ</i>	3820 – 3839	50%	52°C
	PT5-6-R: 5'-ATT ACG GGC ATG AGC CAC TG-3'	4386 – 4367	55%	54°C
PT7 (exón 7)	PT7-F: 5'-GTT AAG TAA CCT GAG GTC AC-3' <i>SEQ</i>	6488 – 6507	45%	50°C
	PT7-R: 5'-AGG CTG TAA TGA GCG CAC TC-3'	7033 – 7014	55%	54°C
PT89 (exones 8 y 9)	PT8-9-F: 5'-ATT GCC TAG TAG CCC AAC TGT GCA-3' <i>SEQ</i> (T <sub>m</sub> =60°C)	7105 – 7128	50%	57°C
	PT8-9-R: 5'-CCT GGA TGC TCA GCT GTT GTC ATC-3' <i>SEQ</i> (T <sub>m</sub> =60°C)	7705 – 7682	54%	59°C
PT10 (exón 10)	PT10-F: 5'-CTT AGA CCT GGG ATT GTT AC-3' <i>SEQ</i>	8656 – 8675	45%	50°C
	PT10-R: 5'-GAA CAT CCT ATG TGT CCC GG-3'	9006 – 8987	55%	54°C
PT11 (exón 11)	PT11-F: 5'-CAA GGG CAG GCA GTT TCC TG-3'	9334 – 9353	60%	56°C
	PT11-R: 5'-TAC TTG GTA TCA GAG CCA GG-3' <i>SEQ</i>	9650 – 9631	50%	52°C
PT12 (exón 12)	PT12-F: 5'-CTG GTC TCT AAG AAA TGG CG-3' <i>SEQ</i>	10043 – 10062	50%	52°C
	PT12-R: 5'-CTT GCT CAA AGT CAC ATG GC-3'	10398 – 10379	50%	52°C
PT13 (exón 13)	PT13-F: 5'-AAG TGG ACT CTC ACC AGC TG-3' <i>SEQ</i>	19664 – 19683	55%	54°C
	PT13-R: 5'-GCC AGG CAA CTG TTT CTA GA-3'	19908 – 19889	50%	52°C
PT14 (exón 14)	PT14-F: 5'-TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC-3' <i>SEQ</i>	19889 – 19908	50%	52°C
	PT14-R: 5'-ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG C-3'	20233 – 20212	50%	55°C

**Tabla 3.4. Características de los cebadores utilizados para el estudio del gen de la proteína C.** Numeración respecto al primer nucleótido (+1) del codón de inicio de la traducción (Met) (381). Los cebadores para amplificar el fragmento PC456LEIDEN tienen una cola de fago M13, marcada en rojo.

PCR (EXÓN AMPLIFICADO)	SECUENCIA CEBADORES 5'→3'	POSICIÓN	% GC	T <sub>m</sub>
PC1 (exón 1)	PC1-F: 5'-GTG CTA GTG CCA CTG TTT GT-3' <i>SEQ</i>	-1590 – -1571	50%	52°C
	PC1-R: 5'-ATC ACC ACC TAG CTC TCT TC-3'	-1371 – -1390	50%	52°C
PC2 (exón 2)	PC2-F: 5'-ACT GCC CGG AGC TCA GAA GT-3'	-50 – -31	60%	56°C
	PC2-R: 5'-ATG CCA CCA GGG CCT TGT AG-3' <i>SEQ</i>	130 – 111	60%	56°C
PC3 (exón 3)	PC3-F: 5'-AGC TCT GCT TCC TCA GAC CC-3' <i>SEQ</i>	1251 – 1270	60%	56°C
	PC3-R: 5'-CCC TGC TGG TTA CCA GCT CG-3'	1558 – 1539	65%	58°C
PC456LEIDEN (exones 4, 5 y 6)	PC456-F: 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT CGA TCC CTG TTT GTCTGG AAG-3'	2841 – 2861	51%	69°C
	PC456-R: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC CTC CCT AGA AAC CCT CCT GA-3'	3555 – 3536	53%	69°C
	5'-CCA CCC CGC ACC CAG CGT GA-3' <i>CEBADOR DE SECUENCIACIÓN (R)</i>	3504 – 3485	75%	62°C
PC7 (exón 7)	PC7-F: 5'-CTT GAA CCC TGC ACT GTG GC-3' <i>SEQ</i>	6011 – 6030	60%	56°C
	PC7-R: 5'-CGC TTC CCT CTC GGT TTC TG-3'	6365 – 6346	60%	56°C
PC8 (exón 8)	PC8-F: 5'-CTA AGC CTA TGC CCA TAT GA-3'	7022 – 7041	45%	50°C
	PC8-R: 5'-AAG AAG CCT CTT GCT TAA GC-3' <i>SEQ</i>	7370 – 7351	45%	50°C
PC9 (exón 9)	PC9-F: 5'-GGC CTC AGG AAA GTG CCA CT-3' <i>SEQ</i>	8317 – 8336	60%	56°C
	PC9-R: 5'-AGA ACA GCA GGC CGG TGT GC-3'	9061 – 9042	65%	58°C

### 3.5.2.2 Optimización de las reacciones de PCR

Para optimizar un protocolo de PCR con el fin de obtener un único producto específico con un elevado rendimiento, el número de factores que deben ser ajustados es bastante elevado:

La **concentración del DNA molde** de partida ya que, debido a la naturaleza termodinámica de la reacción, el ratio cebador-molde determina fuertemente la especificidad y eficiencia de la PCR. Debe añadirse a cada reacción 0,5 – 1 µg de DNA genómico. Además, es necesario que la pureza de las muestras de DNA que se van a amplificar sea elevada puesto que la PCR consiste en múltiples rondas de reacciones enzimáticas y es muy sensible a impurezas.

La **composición y concentración salina** del tampón. Resulta fundamental mantener la fuerza iónica, ya que los cationes neutralizan los grupos fosfato cargados negativamente del esqueleto de DNA debilitando las fuerzas electrorepulsivas entre las cadenas de DNA; esta reducción en las cargas electrorepulsivas facilita la hibridación cebador-molde. La concentración y composición salina de los tampones suele variar, pero generalmente contienen  $K^+$  (KCl) que se une a los grupos fosfato del DNA estabilizando la hibridación de los cebadores al molde, y/o  $NH_4^+$   $[(NH_4)_2SO_4]$  que puede interactuar con los puentes de hidrógeno formados entre las bases desestabilizando los puentes de hidrógeno débiles formados entre bases mal apareadas.

El **pH** del agente tamponante Tris-HCl. Un pH bajo causa depurinización del molde, por lo que mantener el pH da lugar a un mayor rendimiento de la PCR. El pH ideal es 8,4, aunque para la amplificación de fragmentos más largos es mejor un pH 9,0.

La **concentración de  $Mg^{2+}$** , determinada por la concentración de  $MgCl_2$  del tampón. Este ión es necesario como cofactor de la Taq polimerasa y, a su vez, estabiliza la hibridación de los cebadores al molde aunque de manera tanto específica como inespecífica. Se recomienda utilizar una concentración final de 1,5 – 5,0 mM de  $Mg^{2+}$ , aunque suele utilizarse una concentración de 1,5 mM en cada reacción.

El empleo de **agentes coadyuvantes** que aumentan el rendimiento y/o la especificidad de la reacción. Entre ellos están la albúmina de suero bovino (BSA) acetilada, que estabiliza la Taq polimerasa, dimetil sulfóxido (DMSO) que favorece la amplificación de moldes ricos en GCs al disminuir la  $T_m$  del molde, glicerol, Nonidet P40 o la Solución Q (QIAGEN) que también facilita la amplificación de moldes ricos en GCs o con alto grado de estructura secundaria puesto que modifica el comportamiento de melting de los ácidos nucleicos. La concentración de cada

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C \_\_\_\_\_

coadyuvante nunca debe superar el 10% (vol/vol) del volumen final de la reacción de PCR.

La **concentración** de los 4 **dNTPs**: dATP, dCTP, dGTP y dTTP. Se suele utilizar una concentración final en la reacción de 0,2 mM de cada dNTP, aunque la amplificación de fragmentos largos requiere una mayor concentración, que nunca debe ser mayor de 1,5 mM puesto que reduce la fidelidad de la Taq y requiere mayor concentración de  $Mg^{2+}$  por ser un agente quelante de este ión.

La **concentración** óptima de los **cebadores**, que es de 100 – 600 nM, aunque suele utilizarse 200 – 600 nM de cada cebador en función de la PCR. Una elevada concentración de cebadores da lugar a un mayor rendimiento, aunque puede inhibir la reacción por auto-dimerización.

Las **unidades y el tipo de Taq polimerasa**. La Taq polimerasa es un enzima purificado de *E. coli* que expresa el gen de la polimerasa de DNA procedente de la bacteria *Thermus aquaticus*. Se recomienda utilizar 1-1,5 unidades del enzima.

Las **temperaturas y tiempos** de los diferentes **pasos de la reacción**, así como el **número de ciclos de amplificación**. La desnaturalización inicial suele realizarse a 94 – 96°C durante 3 – 5 minutos y el paso de desnaturalización de cada ciclo suele durar de 30 segundos a 1 minuto. El paso de hibridación suele realizarse a 50 – 68°C durante 30 segundos a 1 minuto. La extensión de cada ciclo suele ser suficiente durante 1 minuto a 72°C, pero en el caso de fragmentos de PCR más largos de 1 kb debe emplearse un tiempo de extensión de aproximadamente 1 minuto/kb de DNA. La extensión final es opcional, y suele realizarse a 72°C durante 4 – 10 minutos. El número de ciclos de la PCR suele oscilar entre 25 y 32, dependiendo del número de copias del DNA molde inicial, pudiendo incrementarse hasta 35 aunque puede dar lugar a un mayor ruido de fondo inespecífico debido a la progresiva extinción de la actividad de la Taq polimerasa.

Generalmente, la mayor parte de estos factores se mantienen constantes una vez optimizados por primera vez.

Al optimizar por primera vez una PCR realizamos la amplificación con 5 tampones de PCR de diferente composición para determinar las condiciones salinas, de pH y de concentración de  $Mg^{2+}$  más adecuadas. Para ello programamos un protocolo de amplificación con tiempos y temperaturas estándar para cada uno de los pasos, estableciendo una temperatura de hibridación igual a la  $T_m$  más baja de la pareja de cebadores. Tras analizar los resultados en gel de agarosa, escogemos el tampón que da lugar a la amplificación de un producto específico con un elevado rendimiento y reajustamos las condiciones para un perfeccionamiento del protocolo de amplificación.

En aquellos casos en que el rendimiento sea bajo a causa de una notoria formación de heterodímeros, puede reducirse la concentración de cebadores, y en aquellos casos en los que se considere necesario, puede analizarse el efecto del empleo de agentes coadyuvantes a diferentes concentraciones. A su vez, puesto que la temperatura a la que los cebadores hibridarán a las cadenas de DNA molde desnaturalizadas antes de proceder a la extensión constituye el paso más limitante de la PCR, con el fin de determinar la temperatura de hibridación más adecuada realizamos una amplificación de las muestras generando un gradiente de temperatura en el bloque del termociclador en el paso de hibridación de cada ciclo. De esta forma, las muestras situadas en cada fila del bloque son incubadas a una temperatura diferente permitiendo la rápida valoración de hasta 12 condiciones de amplificación diferentes en un único ensayo; para ello se requiere la disponer de un termociclador con capacidad para realizar gradientes de temperatura a lo largo del bloque.

Asimismo, existen otros tipos de protocolos de PCR que favorecen la difícil amplificación de moldes con una elevada estructura secundaria o ricos en GCs:

PCR Hot Start: mediante este protocolo se intenta evitar que comience la amplificación de las muestras antes de que las dobles cadenas de DNA se hayan separado completamente y así asegurar la máxima especificidad de la reacción. Para ello se desnaturalizan las muestras antes de añadir la Taq polimerasa o los cebadores, o bien una vez el bloque haya alcanzado la temperatura de desnaturalización para evitar la amplificación del DNA al paso por la temperatura de extensión óptima del enzima (72°C).

PCR Touchdown: consiste en diseñar un programa en el que los primeros ciclos de amplificación sean más restrictivos mediante una temperatura de hibridación más elevada para obtener un pool inicial de copias de la región del DNA deseada y, en los ciclos sucesivos, disminuir gradualmente la temperatura de hibridación para permitir la generación de un mayor número de copias a partir del molde, que en este caso serían las copias de la región generadas en los primeros ciclos, ya que son más abundantes que el DNA genómico añadido a la mezcla de la reacción.

Nested PCR: consta de 2 rondas de amplificación. La primera ronda consiste en una amplificación normal y para la segunda ronda se emplea como molde una alícuota del producto obtenido en la primera ronda. En la segunda ronda de PCR se utiliza un nuevo par de cebadores que hibridan en una región interna del producto obtenido en la primera ronda de PCR, así sólo serán amplificados los fragmentos específicos generados anteriormente. Alternativamente se puede realizar una semi-nested PCR, en la que se utiliza un nuevo cebador interno y un cebador común a la primera amplificación.



## **Mutaciones en el Sistema de la proteína C**

---

En estos casos también se recomienda el uso de agentes coadyuvantes como el DMSO que favorecen la amplificación de moldes ricos en GCs, disminuyendo la  $T_m$  del molde. A su vez, pueden utilizarse una serie de Taq polimerasas especialmente diseñadas para la obtención de un mayor rendimiento y/o especificidad en la amplificación.

Una vez optimizado el protocolo, debe establecerse la temperatura de hibridación adecuada para cada termociclador, ya que la eficiencia de la amplificación puede variar.

### **3.5.2.3 Amplificación de las muestras por PCR**

La amplificación de los diferentes fragmentos diseñados correspondientes a los exones y sus regiones flanqueantes de los 4 genes estudiados, se llevó a cabo en tubos de 0,2 ml de pared fina (Eppendorf) utilizando los termocicladores Mastercycler Gradient (Eppendorf) y Touchegene Gradient (Techne).

Todas las reacciones se prepararon en hielo para mantener inalteradas las propiedades de los diferentes componentes utilizados durante el tiempo de manipulación. Resulta fundamental la utilización de guantes y material estéril, así como un juego de pipetas y un área de trabajo exclusiva para PCR, para evitar la presencia de DNasas y la contaminación cruzada entre muestras.

El protocolo de amplificación de cada uno de los fragmentos fue optimizado empíricamente, pero una reacción de PCR estándar es preparada en un volumen final de 50  $\mu$ l que contiene 2  $\mu$ l de DNA genómico, 10 – 30 pmol de cada cebador, 200  $\mu$ M de cada desoxinucleótido trifosfato (PCR Nucleotide Mix, Promega-Innogenetics), 1,25 U de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen, Life Technologies) y el tampón de PCR óptimo para la amplificación a una concentración final 1X.

Los diferentes tampones utilizados para las diferentes amplificaciones de los fragmentos son:

**Tampón G**, compuesto por Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM.

**Tampón L**, compuesto por 10% DMSO (Sigma Chemical Co.), 5  $\mu$ l de BSA 1 mg/ml (New England Biolabs) y Tris-HCl 67 mM pH 8,8, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 16,6 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 6,7  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 6,7 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM (Sigma Chemical Co.).

**Tampón P**, compuesto por Tris-HCl 75 mM pH 9,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y 0,01% Tween-20 (Sigma Chemical Co.).

**Tampón ST**, compuesto por Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,1% Triton X-100 o DMSO y 0,01% gelatina (Sigma Chemical Co.).

En las *Tablas 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8* se indica el tampón utilizado en cada amplificación.

Para la amplificación de un mismo fragmento génico en diferentes muestras, se preparó un *mastermix* compuesto por todos los componentes de la PCR excepto el DNA molde, añadido a cada tubo individualmente, con el fin de evitar errores de pipeteo y homogeneizar las condiciones de amplificación.

En todas las reacciones se incluyó una muestra sin DNA como control negativo de posibles contaminaciones.

En las *Tablas 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8* se indican las condiciones empleadas para la amplificación de cada uno de los fragmentos en los que se dividieron los genes del EPCR, proteína C, trombomodulina y protrombina, respectivamente.

**Tabla 3.5. Condiciones empleadas para la amplificación del gen del EPCR.** En todos los casos el programa consta de 32 ciclos y el paso de extensión es de 45 segundos a 72°C, excepto en EPCR2N que es de 40 segundos.

PCR (EXÓN AMPLIFICADO)	TAMAÑO FRAGMENTO	TAMPÓN PCR	CONCENTRACIÓN CEBADORES	CONDICIONES DESNATURALIZACIÓN	CONDICIONES HIBRIDACIÓN
EPCR1 (exón 1)	289 pb	L	10 pmol	94°C (4 min; 45 seg)	59,5°C (45 seg)
EPCR2N (exón 2)	574 pb	P	30 pmol	95°C (4 min; 1 min)	47°C (40 seg)
EPCR3 (exón 3)	455 pb	L	42 pmol	94°C (4 min; 45 seg)	55°C (45 seg)
EPCR4 (exón 4)	313 pb	L	11 pmol	94°C (4 min; 45 seg)	55°C (45 seg)

**Tabla 3.6. Condiciones empleadas para la amplificación del gen de la proteína C.** En todos los casos el programa consta de 33 ciclos y el paso de extensión es de 45 segundos a 72°C, excepto en la amplificación del fragmento PC456 LEIDEN que es de 2 minutos a 67°C, cuya amplificación se realizó en un termociclador T3 (BIOMETRA).

PCR (EXÓN AMPLIFICADO)	TAMAÑO FRAGMENTO	TAMPÓN PCR	CONCENTRACIÓN CEBADORES	CONDICIONES DESNATURALIZACIÓN	CONDICIONES HIBRIDACIÓN
PC1 (exón 1)	220 pb	G	30,3 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	53°C (45 seg)
PC2 (exón 2)	180 pb	G	26 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	59,2°C (45 seg)
PC3 (exón 3)	308 pb	G	10 pmol (F) y 30,3 pmol (R)	95°C (4 min; 45 seg)	57°C (45 seg)
PC456LEIDEN (exones 4, 5 y 6)	751 pb	L	65 pmol	94°C (4 min; 1 min)	53°C (1 min)
PC7 (exón 7)	355 pb	G	10 pmol (F) y 30,3 pmol (R)	95°C (4 min; 45 seg)	62°C (45 seg)
PC8 (exón 8)	349 pb	G	30,3 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	52°C (45 seg)
PC9 (exón 9)	745 pb	G	10 pmol (F) y 30,3 pmol (R)	95°C (4 min; 45 seg)	61,1°C (45 seg)

**Tabla 3.7. Condiciones empleadas para la amplificación del gen de la trombomodulina.** En todos los casos el programa consta de 33 ciclos y el paso de extensión es de 45 segundos a 72°C.

<b>PCR (EXÓN AMPLIFICADO)</b>	<b>TAMAÑO FRAGMENTO</b>	<b>TAMPÓN PCR</b>	<b>CONCENTRACIÓN CEBADORES</b>	<b>CONDICIONES DESNATURALIZACIÓN</b>	<b>CONDICIONES HIBRIDACIÓN</b>
<b>TMB</b>	244 pb	G	14 pmol (F) y 20 pmol (R)	94°C (4 min; 45 seg)	61°C (45 seg)
<b>TMC</b>	266 pb	G	10 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	68°C (45 seg)
<b>TMD</b>	265 pb	G	100 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	68°C (45 seg)
<b>TME</b>	219 pb	G	10 pmol	94°C (4 min; 45 seg)	60,8°C (45 seg)
<b>TMF</b>	275 pb	G	100 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	71,2°C (45 seg)
<b>TMG</b>	243 pb	G	100 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	64°C (45 seg)
<b>TMH</b>	240 pb	G	100 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	64°C (45 seg)
<b>TMI</b>	153 pb	G	18 pmol (F) y 10 pmol (R)	95°C (4 min; 45 seg)	63°C (45 seg)
<b>TMI-ST</b>	153 pb	ST	35 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	63°C (45 seg)
<b>TMI-1</b>	555 pb	ST	100 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	55°C (45 seg)
<b>TMI-2</b>	384 pb	P	35 pmol (F) y 100 pmol (R)	95°C (4 min; 45 seg)	55°C (45 seg)
<b>TMI-3</b>	630 pb	ST	30 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	62,5°C (45 seg)
<b>TMJ</b>	297 pb	G	100 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	71,2°C (45 seg)

**Tabla 3.8. Condiciones empleadas para la amplificación del gen de la protrombina.** En todos los casos el programa consta de 33 ciclos y el paso de extensión es de 1 minuto a 72°C, excepto en PT34 y PT11 que es de 2 minutos.

<b>PCR (EXÓN AMPLIFICADO)</b>	<b>TAMAÑO FRAGMENTO</b>	<b>TAMPÓN PCR</b>	<b>CONCENTRACIÓN CEBADORES</b>	<b>CONDICIONES DESNATURALIZACIÓN</b>	<b>CONDICIONES HIBRIDACIÓN</b>
<b>PT1 (exón 1)</b>	600 pb	L	30,3 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	55°C (45 seg)
<b>PT1-ST (exón 1)</b>	600 pb	ST	30,3 pmol	95°C (4 min; 30 seg)	55°C (30 seg)
<b>PT2 (exón 2)</b>	860 pb	G	30,3 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	61,5°C (45 seg)
<b>PT34 (exones 3 y 4)</b>	639 pb	L	30,3 pmol	95°C (5 min; 1 min)	59°C (1 min)
<b>PT56 (exones 5 y 6)</b>	566 pb	L	30,3 pmol	94°C (4 min; 45 seg)	62,5°C (45 seg)
<b>PT 56-ST (exones 5 y 6)</b>	566 pb	ST	30,3 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	62,5°C (45 seg)
<b>PT7 (exón 7)</b>	545 pb	L	30,3 pmol	92°C (2 min; 30 seg)	54,8°C (30 seg)
<b>PT89 (exones 8 y 9)</b>	600 pb	L	30,3 pmol	92°C (4 min; 30 seg)	60,5°C (30 seg)
<b>PT10 (exón 10)</b>	350 pb	L	33,3 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	56,5°C (45 seg)
<b>PT11 (exón 11)</b>	316 pb	L	30,3 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	60,2°C (45 seg)
<b>PT12 (exón 12)</b>	355 pb	L	30,3 pmol	95°C (4 min; 45 seg)	57°C (45 seg)
<b>PT13 (exón 13)</b>	244 pb	ST	30,3 pmol	92°C (4 min; 45 seg)	58°C (45 seg)
<b>PT14 (exón 14)</b>	344 pb	L	30,3 pmol	92°C (4 min; 45 seg)	59,2°C (45 seg)

#### **3.5.2.4 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR**

Para comprobar la eficiencia y especificidad de la amplificación de los fragmentos obtenidos por PCR, una alícuota de la misma se sometió a electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio (BrEt), y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Se utilizaron en todos los casos geles de agarosa al 1,5%, porcentaje adecuado en función del tamaño de los fragmentos amplificados (382). Éstos se prepararon utilizando agarosa MS8 (Pronadisa, Hispanlab) en tampón TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 2 mM, pH 8,0) conteniendo 0,5 µg de BrEt (Sigma Chemical Co.) por ml de gel. Las muestras aplicadas al gel contenían 8 µl de cada uno de los productos amplificados mezclados con 2 µl tampón de carga [50% glicerol (Quimivita), EDTA-Na<sub>2</sub> 5 mM pH 8,0, 0,008% azul de bromofenol (Sigma Chemical Co.) y 0,01% Xylene cyanol (Sigma Chemical Co.)].

#### **3.5.3 SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE PCR**

El fundamento del método de secuenciación consiste en generar fragmentos de DNA de cadena simple con la misma secuencia y cuyos tamaños sólo se diferencian en una única base, y marcar estas moléculas a secuenciar, bien radiactivamente o con fluorocromos. Las moléculas de DNA con la misma secuencia y que sólo se diferencien en una base en longitud de cadena, se pueden separar por electroforesis en geles desnaturizantes de acrilamida, permitiendo la lectura simultánea del orden de unos 600 nucleótidos consecutivos de la secuencia (371).

El método que empleamos para la secuenciación es el método enzimático desarrollado por Sanger (383), pero realizando el marcaje de los fragmentos con fluorocromos para eliminar la radiactividad y automatizar la lectura e interpretación de la secuencia. Se parte de numerosas copias de un fragmento de DNA lineal de cadena simple y se necesita un cebador que sirva de enganche para el inicio de la síntesis de nuevos fragmentos del DNA que vamos a marcar y secuenciar. Este cebador puede ser específico y complementario a una región localizada concreta de la secuencia, o puede representar una pequeña secuencia al azar sin localización definida *a priori*.

El proceso completo para la secuenciación de un fragmento de DNA consiste en:

- 1. - Amplificación de la región de DNA a secuenciar por PCR.** Mediante una PCR específica debe amplificarse la región del DNA genómico que deseamos secuenciar, tal y como se especifica en el apartado 3.5.2, la cual servirá como DNA molde para la reacción de secuenciación.
- 2. - Purificación de los fragmentos de PCR.** Tras comprobar la amplificación específica de la región deseada, deben purificarse los fragmentos de DNA amplificados con el fin de eliminar todos los componentes de la mezcla de PCR, los cuales podrían interferir de forma negativa en la subsiguiente reacción de secuenciación.
- 3. - Cuantificación del DNA de las muestras de PCR.** Antes de preparar la reacción de secuenciación, debe conocerse la concentración del DNA molde de partida.
- 4. - Reacción de secuenciación.** Consiste en una nueva reacción de amplificación de los fragmentos de PCR, pero utilizando un único cebador específico puesto que la región del DNA a secuenciar ya está delimitada. Mediante esta reacción se obtiene una población heterogénea de fragmentos idénticos pero que difieren en una base de longitud. En la primera parte del proceso, el cebador genera copias de la cadena de DNA molde utilizando los cuatro desoxinucleótidos (dNTPs) necesarios para la extensión de las cadenas durante la reacción de secuenciación. Simultáneamente se va produciendo la terminación de las nuevas cadenas en diferentes posiciones de manera aleatoria por la incorporación del didesoxinucleótido correspondiente (ddUTP, ddGTP, ddATP y ddCTP). Los didesoxidos son nucleótidos trifosfato que carecen de grupos OH tanto en el carbono 2' como en el 3' de la ribosa. Pueden ser incorporados en una cadena de DNA en síntesis por una polimerasa a través de su grupo 5' trifosfato, pero la ausencia del residuo 3'-hidroxilo imposibilita la formación de un enlace fosfodiéster con el dNTP contiguo. De esta manera, impiden el crecimiento de la cadena y paralizan la síntesis (384). Cada uno de los cuatro ddNTPs terminadores, incluidos en el ensayo de Beckman Coulter empleado, contiene un fluoróforo distinto cuyos espectros de excitación y emisión están cerca de la región del infrarrojo para poder así identificar cada una de las bases.

5. - **Purificación de los productos de la reacción de secuenciación.** Antes de realizar la lectura de la secuencia de los fragmentos en el secuenciador, las muestras deben ser purificadas mediante una precipitación con isopropanol.
6. - **Electroforesis en capilares y lectura de la secuencia.** Finalmente, estas muestras constituidas por una población heterogénea de fragmentos de todos los diferentes tamaños posibles, son analizadas por electroforesis vertical en gel de acrilamida en el interior de un capilar. Al avanzar uno a uno los fragmentos de diferente longitud a través del gel, pasan por delante de un rayo láser que excita el fluorocromo del ddNTP en posición terminal de cada fragmento e identifica cada base, generando así la secuencia completa del fragmento de DNA secuenciado. Los resultados son examinados por un ordenador, ya que los espectros de emisión de cada fluoróforo se solapan ligeramente (385).

Del par de cebadores utilizado para la amplificación de cada fragmento, debe seleccionarse aquel con que se quiera secuenciar cada muestra, el directo o el reverso. En ocasiones, los cebadores empleados en la PCR previa no pueden utilizarse en la reacción de secuenciación porque generan mucho ruido de fondo. En estos casos se puede diseñar un cebador interno al fragmento de PCR amplificado para evitar el ruido de fondo inespecífico, o emplear cebadores especiales, como son aquellos con colas del fago M13, los cuales suelen dar buenos resultados ya que el fragmento de secuencia extra añadido en el extremo 5' (que no se pegará a la muestra de PCR a secuenciar) favorece la estabilidad de la unión de la región homóloga del cebador al molde de PCR.

Si la región que vamos a amplificar es rica en GCs o forma parte de una región altamente repetitiva del genoma, existen una serie de ensayos especiales para la secuenciación de este tipo de regiones del DNA con un importante grado de estructura secundaria.

La solución de dNTP Mix, suministrada en el ensayo empleado, contiene dITP como análogo de dGTP para reducir las compresiones generadas por la presencia de estructuras secundarias, ya que forma pares de bases I-C que solamente contienen dos puentes de hidrógeno en lugar de los tres formados por los pares G-C, favoreciendo la migración más rápida de los fragmentos en el gel de poliacrilamida (384, 386, 387).

En caso de que aparezca una mutación, ésta debe comprobarse secuenciando por el extremo opuesto para asegurarse que no es un artefacto generado en la reacción. En el



caso de que se quiera comprobar la existencia de un cambio de base en la región próxima al extremo del fragmento, deberá diseñarse una estrategia alternativa como el empleo de enzimas de restricción, puesto que la región próxima al cebador utilizado en la reacción de secuenciación nunca se resuelve correctamente ya que se están incorporando los ddNTPs marcados y se obtiene una mezcla heterogénea de señales.

### 3.5.3.1 Purificación de los fragmentos de PCR

Tras la amplificación, la muestra de PCR contiene una mezcla heterogénea de fragmentos amplificados específicos, cebadores, nucleótidos no incorporados, enzima, sales, detergentes (DMSO, Tween 20), y probablemente fragmentos amplificados inespecíficos que interfieren en la reacción de secuenciación. Existen diferentes tipos de técnicas para la purificación de los fragmentos a secuenciar, como son la extracción del DNA a partir de la banda del gel de agarosa, la extracción con fenol-cloroformo y la extracción con CsCl. Sin embargo, todos estos métodos de purificación no evitan que la subsiguiente reacción de secuenciación de lugar a una amplificación inespecífica o a ruido de fondo, por lo que en la actualidad se emplean ensayos que incluyen columnas de silica-gel para la purificación de las muestras de PCR. En nuestro caso empleamos un ensayo comercial (*QIAquick PCR Purification Kit*, Qiagen) que permite la recuperación de un 90 – 95% de DNAs con un tamaño de 100 pb a 10 kb, siendo eliminados los contaminantes y todos los fragmentos de un tamaño inferior a 40 pb, como son los cebadores.

El protocolo fue el siguiente:

1. - Un máximo de 10 µg de DNA se mezcla con 5 volúmenes del tampón suministrado por la casa comercial (tampón PB), y se introduce en la columna. El tampón PB proporciona el pH y la concentración de sales adecuada para la adsorción del DNA al silica-gel, ya que ésta solamente ocurre en presencia de una elevada concentración de sales caotrópicas, lo cual modifica la estructura del agua (388, 389). La adsorción del DNA al silica-gel depende del pH, siendo la adsorción del 95% a  $\text{pH} \leq 7,5$  y reduciéndose drásticamente a pHs más elevados. Si el pH de la mezcla es  $>7,5$ , se puede obtener el pH óptimo para su adsorción añadiendo un pequeño volumen de acetato sódico 3 M, pH 5,0.
2. - Tras la adsorción del DNA a la columna, ésta se centrifuga a  $\geq 10000$  x g durante 30–60 segundos para eliminar todo el resto de componentes.

3. - Las sales son eliminadas mediante un lavado con 0,75 ml del tampón suministrado por la casa comercial (tampón PE), que contiene etanol. Es importante eliminar mediante una doble centrifugación durante 1 minuto a  $\geq 10000 \times g$  todo el tampón PE para evitar que interfiera negativamente en reacciones enzimáticas posteriores.
4. - Una vez purificado el DNA, se eluye de la columna con tampón EB (Tris-Cl 10 mM, pH 8,5) o agua desionizada estéril, y se recupera en un tubo estéril tras centrifugar 1 minuto a  $\geq 10000 \times g$ . La eficiencia de la elución es fuertemente dependiente de la concentración de sales y del pH del tampón de elución. Al contrario que la adsorción, la elución es más eficaz en condiciones de baja concentración de sales y pH básico (siendo la elución máxima entre pH 7,0 y 8,5). Si las muestras son eluidas con agua estéril, el pH debe ser el adecuado y el DNA debe guardarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  ya que es degradado en ausencia de un agente tamponante. Sería posible eluir las muestras en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) pero no es recomendable porque el EDTA podría inhibir otras reacciones enzimáticas posteriores, como la de secuenciación.

El rendimiento de la recuperación y concentración del DNA depende de 3 factores: el volumen del tampón de elución, la forma de aplicar el tampón a la columna y el tiempo de incubación del tampón en la columna. Si se eluye con un volumen de tampón  $\leq 50 \mu\text{l}$ , debe añadirse directamente al centro de la columna, y si se eluye con el volumen mínimo recomendado de  $30 \mu\text{l}$  debe incubarse durante 1 minuto. Si la columna es incubada 1 minuto utilizando  $30 \mu\text{l}$  de tampón EB, el rendimiento de la purificación será similar, pero el DNA estará hasta 1,7 veces más concentrado que si es eluido en  $50 \mu\text{l}$  de tampón sin realizar la incubación.

### **3.5.3.2 Cuantificación del DNA de las muestras de PCR**

Existen diferentes métodos para cuantificar el DNA de las muestras a secuenciar, como son: la medida de la absorción a 260 nm, la cuantificación con *Picogreen*, la cuantificación espectrofotométrica de un pequeño volumen de la muestra mediante el *BioPhotometer* (Bio-Rad Laboratories) y la cuantificación en gel de agarosa mediante comparación de la intensidad de bandas con un marcador de peso molecular estándar. Este último método es el más comúnmente utilizado y se realiza comparando

la intensidad de la banda de un volumen concreto de la muestra problema, en nuestro caso 5 µl, con la intensidad de las bandas del mismo volumen del marcador *DNA Mass Ladder* (Invitrogen) cuya concentración de DNA en cada una de las bandas se conoce.

A pesar de no ser una técnica de cuantificación altamente precisa, presenta numerosas ventajas tanto de sencillez y rapidez como de economía frente a las técnicas espectrofotométricas (390).

### 3.5.3.3 Reacción de secuenciación

Con el fin de generar la población heterogénea de fragmentos de todos los diferentes tamaños posibles correspondientes a la región del DNA cuya secuencia vamos a leer en el secuenciador, la reacción de secuenciación de las muestras se realizó utilizando un ensayo comercial (*CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, Beckman Coulter).

Para llevar a cabo las reacciones de secuenciación, debe establecerse las condiciones de una serie de factores:

**Concentración de DNA**, la cual varía en función de la naturaleza del DNA a secuenciar. En nuestro caso, para la secuenciación de fragmentos de PCR se requieren 75 fmoles de muestra amplificada.

La **proporción cebador:molde** debe ser óptima para asegurar un buen rendimiento de la reacción, siendo el límite inferior más adecuado un ratio molar 40:1. En nuestro caso empleamos 75 fmoles de muestras de DNA amplificado y 10 pmol de cebador, lo cual equivale a un ratio molar 133,33:1.

Las cantidades del resto de componentes de la reacción de secuenciación, es decir, de **10X Sequencing Reaction Buffer**, de cada uno de los cuatro **ddNTPs terminadores**, de la solución de **dNTP Mix** suministrada que contiene los 4 dNTPs necesarios para la extensión de las cadenas durante la reacción de secuenciación y de las unidades de **AmpliTaQ FS** han sido cuidadosamente optimizadas por los fabricantes del ensayo para la obtención de los mejores resultados. Si las cantidades de estos componentes son modificadas, podría dar lugar a diferencias en las frecuencias de terminación de las cadenas durante las reacciones de secuenciación.

Las reacciones de secuenciación se realizaron en tubos de 0,2 ml de pared fina. Estas se prepararon en hielo para mantener inalteradas las propiedades de los diferentes componentes utilizados durante el tiempo de manipulación. Resulta fundamental la utilización de guantes y material estéril para evitar la presencia de DNasas y la

contaminación cruzada entre muestras, lo cual daría lugar a una lectura de la señal inespecífica.

Salvo en el caso de tratarse de fragmentos con requisitos especiales de amplificación, las reacciones de secuenciación se prepararon en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  que contenía 75 fmol de DNA de la muestra de PCR purificada, 10 pmol del cebador, y 6  $\mu\text{l}$  de un *mastermix* que contiene todo el resto de componentes para la reacción de secuenciación [1  $\mu\text{l}$  de 10X Sequencing Reaction Buffer, 0,5  $\mu\text{l}$  de dNTP mix (5 mM de cada desoxinucleótido trifosfato), 1  $\mu\text{l}$  de cada terminador (ddUTP, ddGTP, ddATP y ddCTP) y 0,5  $\mu\text{l}$  de polimerasa AmpliTaq FS].

Una reacción de secuenciación estándar consistió de una desnaturalización inicial a 96°C durante 3 minutos seguida de 30 ciclos consistentes en una desnaturalización a 96°C durante 20 segundos, hibridación a 50°C durante 20 segundos y extensión a 60°C durante 4 minutos, llevada a cabo en un termociclador T3 (Biometra).

Al utilizar dITP como análogo de dGTP junto con el enzima AmpliTaq FS, la temperatura de extensión utilizada se reduce a 60°C en lugar de 72°C.

#### **3.5.3.4 Purificación de los productos de la reacción de secuenciación**

Los productos obtenidos en las reacciones de secuenciación se purificaron mediante precipitación con isopropanol, incubando los 20  $\mu\text{l}$  de la muestra con 60  $\mu\text{l}$  de 100% isopropanol durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación a 14000 rpm durante 20 minutos. Se lavó el precipitado y las paredes del tubo con 250  $\mu\text{l}$  de 75% isopropanol (vol/vol) y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos, para evitar la obtención de una señal contaminante generada por los ddNTPs no incorporados que hubieran podido quedar secos en la pared del tubo. Tras secar las muestras durante 20 minutos por aspiración en el *SpeedVac*, se resuspendieron exhaustivamente en 40  $\mu\text{l}$  de formamida desionizada (Beckman Coulter).

#### **3.5.3.5 Electroforesis en capilares y lectura de la secuencia**

El secuenciador utilizado fue el *CEQ 2000 DNA Analysis System* (Beckman Coulter), sistema formado por 8 capilares.

## **Mutaciones en el Sistema de la proteína C \_\_\_\_\_**

Las muestras purificadas y resuspendidas en formamida desionizada se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante para proceder a la lectura e interpretación de su secuencia.

El secuenciador realiza un procesado de los datos al mismo tiempo que los interpreta, pero en aquellos casos en que la lectura del cromatograma no fue óptima se realizó un análisis especial de los datos con el software del sistema.

Durante la interpretación de los resultados cabe tener en cuenta la existencia de determinados patrones de picos que se repiten de manera común:

- Detrás de una serie de Ts, las Cs están intensificadas.
- Detrás de una serie de Ts, la G es fuerte.
- Detrás de una T, la A puede ser débil.
- La tercera G en serie es débil.
- Detrás de la G, la C es débil.
- Si detrás de una G hay una serie de Cs, la primera es débil.
- Detrás de la G, la T es débil.
- Detrás de la G, la A es muy fuerte.
- Detrás de la A, la G es muy débil.
- Cualquier base entre dos As, suele tener un pico A debajo.
- Normalmente hay un pico T muy alto al principio de la secuencia.
- Se suele añadir un pico A al final de la secuencia.

### **3.5.4 POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA**

La técnica del polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) constituye una estrategia muy útil para la detección y el análisis de mutaciones en una sola base (SNP) del DNA. Junto con otras técnicas también basadas en la separación de las cadenas de DNA por electroforesis, ha sido desarrollada para el análisis simple y

reproducibile de cambios génicos en sustitución de ensayos más clásicos como el *Southern blot* (382).

La técnica del SSCP se basa en el hecho de que el DNA de cadena simple tiene una estructura secundaria específica de su secuencia. Así, diferencias tan pequeñas como una única base pueden afectar a esta estructura secundaria, cuyos cambios pueden ser detectados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (391). Ello es posible por las diferencias en la movilidad de las cadenas, que dan lugar a un patrón de bandas diferente en función del genotipo.

La capacidad de detectar cambios en una sola base reside en diferentes factores que afectan a la resolución de las bandas, las cuales deben determinarse empíricamente para cada estudio:

**Tamaño del fragmento.** Con fragmentos hasta un máximo de 350 pb, la eficiencia estimada para la detección de mutaciones es del 90 – 95%, pero ésta disminuye a medida que aumenta el tamaño del fragmento amplificado (392).

**Temperatura del gel.** La temperatura óptima del tampón de electroforesis suele oscilar entre 4 – 25°C.

**Aditivos en el gel.** Puede añadirse 5 – 10% de **glicerol** (concentración final) al gel para mejorar la diferencia de movilidad de los fragmentos. Puesto que el glicerol puede reducir la movilidad de las cadenas simples de DNA a baja temperatura, solamente se utiliza en electroforesis realizadas a temperatura ambiente (392).

**Ratio de entrecruzamiento:** el ratio acrilamida/bis-acrilamida determina el porcentaje de entrecruzamiento (*crosslinking*).

**Concentración del tampón:** los geles se suelen correr en TBE 0,5 – 1X. En ocasiones, el TBE 0,5X da lugar a resultados ligeramente mejores (393, 394). El TBE presenta la ventaja frente a otros tampones como el TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM pH 8,0) de que la capacidad de conducción es más duradera (395).

Las muestras de DNA amplificado deben ser desnaturizadas antes de la electroforesis para separar las dobles cadenas. Seguidamente, deben incubarse en hielo, al menos 5 minutos, para evitar que las dobles cadenas renaturalicen y facilitar que adquieran una conformación secundaria característica en función de su secuencia de DNA (396-399). El agente desnaturizante que se utiliza es la formamida, presente en el tampón de carga [98,75% formamida (Sigma Chemical Co.), EDTA-Na<sub>2</sub> 5 mM pH 8,0, 0,0125% azul de bromofenol y 0,0125% *Xylene cyanol*]. A un volumen de DNA se le añade un volumen igual de tampón de carga, y la muestra se incuba durante 7 minutos a 95°C. El tampón de carga también aporta densidad a las muestras para

## **Mutaciones en el Sistema de la proteína C**

---

facilitar la penetración en los pocillos del gel, y contiene los colorantes azul de bromofenol y xylene cyanol que avanzan en el gel a una distancia conocida en función de la composición del gel, facilitando el seguimiento de la electroforesis (400).

Es importante incluir en cada gel controles positivos de cada uno de los posibles genotipos y una muestra sin desnaturalizar como control de la electroforesis.

La técnica del SSCP se llevó a cabo con el *Dcode Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad Laboratories).

### **3.5.4.1 Tinción de geles de poliacrilamida con plata**

Para observar el patrón de bandas obtenido tras la electroforesis, el gel se tiñe con plata. Para una tinción homogénea, todas las incubaciones deben ser realizadas a temperatura ambiente en agitación suave y constante, y el gel debe quedar cubierto por todas las soluciones de incubación.

El DNA presente en el gel se fija incubando el gel con 10% etanol (vol/vol) durante un mínimo de 10 minutos. Tras decantar la solución, el gel se oxida con 1% HNO<sub>3</sub> (vol/vol) durante 3 minutos, seguido de dos lavados con agua destilada. Posteriormente, se tiñe el gel con una solución acuosa de 2 gr/litro de AgNO<sub>3</sub> durante 20 minutos y se lava brevemente con agua destilada para eliminar el exceso de plata no fijada. El revelado se realiza con una solución de 2,96% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (peso/vol) y 0,02% formaldehído (vol/vol) hasta el oscurecimiento del tampón. A continuación, se decanta el tampón y se repite el revelado hasta observar el patrón de bandas con una intensidad adecuada. Finalmente se detiene la tinción con 5% ácido acético (vol/vol) y el gel puede ser conservado en agua destilada hasta su secado.

### **3.5.4.2 Genotipado del polimorfismo A4600G (Ser219Gly) en el gen del receptor endotelial de la proteína C**

La detección del polimorfismo A4600G, que produce un cambio de aminoácido de Serina a Glicina en el residuo 219 situado en la región transmembrana del gen del EPCR, se realizó mediante SSCP de una alícuota de 10 µl del fragmento EPCR4 amplificado, en un gel al 8% de poliacrilamida de 1 mm de espesor, compuesto por una solución al 30% acrilamida/bis 37,5:1 (Bio-Rad Laboratories), 1X TBE, 7% glicerol, 0,1% persulfato amónico (Bio-Rad Laboratories), 0,1% TEMED (Bio-Rad Laboratories).

La electroforesis se llevó a cabo en tampón TBE 1X, a temperatura ambiente (22°C-24°C) durante 17 horas y 20 minutos a 125 V seguido de 1 hora y media a 175 V.

El patrón de bandas en el gel se visualizó tras la tinción del mismo con plata.

#### **3.5.4.3 Genotipado del polimorfismo C1418T (Ala455Val) en el gen de la trombomodulina**

La detección del polimorfismo C1418T, que produce un cambio de aminoácido de Alanina a Valina en el residuo 455 situado en el sexto motivo tipo *EGF* del gen de la trombomodulina, se realizó mediante SSCP de una alícuota de 10 µl de PCR de los fragmentos TMI o TMI-ST amplificados, en un gel al 8% de poliacrilamida de 1 mm de espesor, compuesto por una solución al 30% acrilamida/bis 37,5:1, 1X TBE, 7% glicerol, 0,1% persulfato amónico, 0,1% TEMED.

La electroforesis se llevó a cabo en tampón TBE 1X, a temperatura ambiente (22°C-24°C) durante 3 horas y media a 360 V.

El patrón de bandas se visualizó tras la tinción con plata del gel.

#### **3.5.5 GENOTIPADO DE POLIMORFISMOS POR DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN**

Los enzimas de restricción son proteínas sintetizadas por un gran número de bacterias como mecanismo de protección frente al ataque de agentes patógenos como los bacteriófagos (371), puesto que son enzimas que reconocen secuencias específicas de DNA de generalmente cuatro a seis nucleótidos y son capaces de cortar el DNA de doble cadena en esta diana de restricción o en una posición adyacente. Es por ello que estos enzimas de restricción constituyen unas herramientas ampliamente utilizadas en biología molecular (401).

Cada enzima de restricción tiene unos requerimientos de almacenamiento, temperatura y pH óptimos, cofactores, composición salina y fuerza iónica que afectan a la estabilidad y actividad del enzima.

Es conveniente utilizar BSA acetilada a una concentración final de 0,1 mg/ml para inactivar posibles nucleasas y proteasas contaminantes, ya que aumenta la calidad y eficiencia del enzima con DNAs no purificados.



## Mutaciones en el Sistema de la proteína C \_\_\_\_\_

Una *unidad de actividad* se define como la cantidad de enzima de restricción requerida para producir la digestión completa de 1 µg de DNA en 60 minutos a 37°C en un volumen final de la reacción de 50 µl, pero el número de unidades de enzima a utilizar en cada estudio debe determinarse de forma empírica ya que cada enzima, aunque sea suministrado con el mismo número de unidades por µl que otro, presenta diferente tasa de actividad y actúa de forma diferente sobre distintos tipos de DNA sustrato. También pueden observarse diferencias entre un mismo enzima suministrado por diferentes casas comerciales. Los DNAs de diferente tamaño o diferente número de puntos de corte requieren diferentes cantidades de enzima para ser digeridos completamente debido a la interacción entre el enzima y la estructura superior alrededor de sus sitios de reconocimiento, con lo que el dato suministrado de “cantidad de enzima de restricción requerida para digerir completamente 1 µg de DNA sustrato” y la cantidad real a emplear no siempre coinciden. Por otro lado, si se utilizan cantidades excesivas de muestra de DNA o de enzima puede dar lugar a resultados aberrantes, puesto que los componentes de la solución en la que se encuentra el DNA pueden inhibir la reacción enzimática, y un gran exceso de enzima puede saturar la reacción. Normalmente se utiliza un exceso de enzima de 2 a 10 veces sobre la concentración de DNA.

Es recomendable incluir en cada reacción diferentes tipos de controles:

- DNA sin digerir.
- DNA control suministrado por la casa comercial.
- Muestras de DNA del mismo tipo que las muestras problema, de genotipo conocido.
- Una mezcla de todos los componentes de la reacción, pero sin enzima.
- Diferentes tipos de marcadores de peso molecular en más de un pocillo del gel.

Las mezclas de digestión deben incubarse a la temperatura adecuada para el enzima de restricción de 1 a 4 horas. Las digestiones incubadas durante toda la noche son innecesarias y pueden dar lugar a la degradación del DNA.

En función del peso molecular del DNA, la digestión se puede comprobar en gel de agarosa o en gel de poliacrilamida. La definición de las bandas viene fundamentalmente determinada por la calidad de la muestra de DNA de partida (rendimiento de la PCR, etc.) y la calidad de resolución depende de la diferencia de tamaño de las bandas, ya que las bandas han de separarse suficientemente para

distinguirse de forma individual pero no tanto como para que las bandas de bajo peso molecular se vuelvan difusas.

En la electroforesis puede que: no se observen bandas, que las bandas sean muy anchas o que migren de forma atípica. Esto puede ser debido a que el DNA, el enzima, y/o proteínas contaminantes formen complejos que no penetran bien en el gel o son teñidas por el BrEt. Puede solucionarse añadiendo agentes desnaturalizantes como el SDS a una concentración final ~ 0,1%.

### **3.5.5.1 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión enzimática**

Las moléculas de DNA con un tamaño entre 200 pb y 50 kb de longitud se pueden separar en geles de agarosa de diversa concentración. El tipo, porcentaje y grosor del gel de agarosa debe calcularse en función del peso molecular de las bandas que resulten tras la digestión, así como de la concentración final obtenida con el fin de poder cargar el volumen óptimo de la digestión en los pocillos y obtener una buena definición. Cabe tener en cuenta que las bandas de menor peso molecular siempre son menos intensas y, tal y como van avanzando en el gel, pierden definición y van haciéndose difusas, por lo que debe fotografiarse el gel en el momento en que todo el patrón de bandas pueda verse con claridad.

Al gel se le añade una concentración final de BrEt de 0,5 µg/ml.

### **3.5.5.2 Electroforesis en gel de acrilamida de los productos de la digestión enzimática**

Los geles de acrilamida se utilizan para separar fragmentos pequeños de DNA (5 – 500 pb), puesto que permiten una separación óptima de las diferentes bandas. El porcentaje final de acrilamida del gel depende del rango de pesos moleculares de las bandas que se obtendrán. El gel se puede preparar añadiendo componentes como glicerol que ayudan a incrementar la resolución.

Estos parámetros, así como el tiempo y voltaje de la electroforesis, deben determinarse empíricamente para cada estudio. El gel se suele correr en tampón TBE 0,5X.

La tinción de plata que se realiza a estos geles es mucho más sensible y así podremos determinar el genotipo de las muestras con mayor precisión. Esta tinción rápida consiste en una incubación de 5 a 8 minutos del gel con una solución de  $\text{AgNO}_3$  y el revelado en una solución de NaOH y formaldehído al 37% (NaOH 0,75 M, formaldehído 37% 0,14 M) hasta obtener la intensidad de bandas deseada. Posteriormente el gel puede conservarse en agua desionizada hasta su posterior secado.

### 3.5.5.3 Genotipado del polimorfismo G2876A en el gen del EPCR con *XspI*

Al analizar las dianas de restricción en función del polimorfismo G2876A situado en el intrón II del gen del EPCR, se observó que la presencia del alelo mutado A genera una nueva diana de restricción para el enzima *XspI* (Takara Bio Inc.), por lo que se utilizó este enzima para genotipar las muestras, y cuya diana de restricción es la secuencia:



Una reacción estándar se preparó en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  conteniendo 9  $\mu\text{l}$  de la muestra de PCR del fragmento EPCR2N y 10 unidades de enzima *XspI* en tampón K (Tris-HCl 20 mM pH 8,5,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, DTT 1 mM, KCl 100 mM). La digestión se llevó a cabo en tubos de 0,2 ml de pared fina, incubando durante 3 horas a 37°C en un termociclador. Transcurrido este tiempo, se paró la reacción con 5  $\mu\text{l}$  tampón de carga (1% SDS, 50% glicerol, 0,05% azul bromofenol) y los resultados se visualizaron en un minigel de poliacrilamida al 7% de 1 mm de grosor, utilizando como referencia 0,12  $\mu\text{g}$  del marcador de peso molecular *50 bp DNA Ladder* (Invitrogen). La electroforesis se realizó durante 14 minutos a 300V en tampón TBE 0,5X, y los geles fueron teñidos con plata mediante el protocolo rápido como se indica en el apartado anterior, con una incubación con  $\text{AgNO}_3$  de 8 minutos.

En presencia de la mutación, el fragmento amplificado de 574 pb da lugar a tres fragmentos de 454, 84 y 36 pb. Así, el alelo común G genera dos fragmentos de 454 y 120 pb y el alelo mutado A escinde este último dando lugar a un total de tres fragmentos de 454, 84 y 36 pb.

#### 3.5.5.4 Genotipado del polimorfismo T3997C en el gen del EPCR con *MboI*

Al analizar las dianas de restricción en función del polimorfismo T3997C situado en el intrón II del gen del EPCR, se observó que la presencia del alelo mutado C elimina una diana de restricción para el enzima *MboI* (Promega, Innogenetics), por lo que se utilizó este enzima para genotipar las muestras, y cuya diana de restricción es la secuencia:

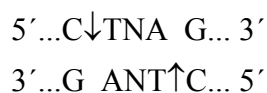


Una reacción estándar se preparó en un volumen final de 30  $\mu\text{l}$  conteniendo 16  $\mu\text{l}$  de la muestra de PCR del fragmento EPCR3, 3  $\mu\text{g}$  BSA acetilada y 2 unidades de enzima *MboI* en tampón C (Tris-HCl 10 mM pH 7,9, NaCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, DTT 1 mM). La digestión se llevó a cabo en tubos de 0,2 ml de pared fina, incubando durante 3 horas a 37°C en un termociclador. Transcurrido este tiempo, los resultados se visualizaron inmediatamente con un transiluminador de luz ultravioleta tras la electroforesis en gel de agarosa al 2,5% de 8,5 mm de grosor, utilizando como referencia 0,375  $\mu\text{g}$  del marcador de peso molecular 50 bp *DNA Ladder*.

En presencia de la mutación, el fragmento de PCR de 456 pb permanece íntegro, mientras que en su ausencia el fragmento es cortado por el enzima. De esta manera, el alelo común T genera dos fragmentos de 368 y 88 pb, mientras que el alelo mutado C da lugar a un sólo fragmento de 456 pb.

#### 3.5.5.5 Genotipado del polimorfismo G4678C en el gen del EPCR con *DdeI*

Al analizar las dianas de restricción en función del polimorfismo G4678C situado en la región 3' no traducida del gen del EPCR, se observó que la presencia del alelo mutado C genera una diana de restricción para el enzima *DdeI* (Invitrogen), por lo que se utilizó este enzima para genotipar las muestras, y cuya diana de restricción es la secuencia:



## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

Una reacción estándar se preparó en un volumen final de 24 µl conteniendo 16 µl de la muestra de PCR del fragmento EPCR4 y 2 unidades de enzima *DdeI* en tampón REACT3 (Tris-HCl 50 pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM). La digestión se llevó a cabo en tubos de 0,2 ml de pared fina, incubando durante 3 horas a 37°C en un termociclador. Transcurrido este tiempo, los resultados se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta tras la electroforesis en gel de agarosa al 2,5% de 8,5 mm de grosor, utilizando como referencia 0,375 µg del marcador de peso molecular  $\phi$ 174/*HaeIII* (Invitrogen).

En presencia de la mutación, el fragmento de 314 pb da lugar a dos fragmentos de 252 y 62 pb. Así, el alelo común G genera un único fragmento de 314 pb, mientras que el alelo mutado C da lugar a dos fragmentos de 252 y 62 pb.

### 3.5.5.6 Genotipado del polimorfismo G1456T (Asp468Tyr) en el gen de la trombomodulina con *RsaI*

Al analizar las dianas de restricción en función del polimorfismo G1456T que produce un cambio de Aspártico a Tirosina en el aminoácido 468 situado entre el dominio transmembrana y el sexto motivo tipo *EGF* de la trombomodulina, se observó que la presencia del alelo mutado T genera una nueva diana de restricción para el enzima *RsaI* (Roche), por lo que se utilizó para genotipar las muestras, y cuya diana de restricción es la secuencia:



Una reacción estándar se preparó en un volumen final de 25 µl conteniendo 6 µl de la muestra de PCR del fragmento TMI y 2,5 unidades de enzima *RsaI* en tampón L (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditioeritritol 1mM). La digestión se llevó a cabo en tubos de 0,2 ml de pared fina, incubando durante 2 horas a 37°C en un termociclador.

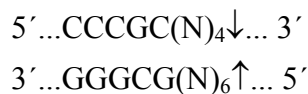
No encontramos ningún paciente ni control portador de esta mutación, por lo que incluimos el plásmido *pGL3-Basic* como control positivo en la digestión para comprobar que las condiciones empleadas en la digestión fueron óptimas para la actividad del enzima. A su vez, incluimos en la muestra del plásmido una alícuota del control negativo de la PCR para asegurarnos que los componentes de la PCR no interfieren en la actividad del enzima. Este plásmido contiene 9 dianas para *RsaI* generando un patrón de bandas con 10 fragmentos.

Finalizada la reacción, la mezcla de digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 3% de 8,5 mm de grosor, utilizando como referencia 0,375 µg del marcador de peso molecular *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen), y la(s) banda(s) separada(s) se visualiza(n) con un transiluminador de luz ultravioleta.

En presencia de la mutación, el fragmento de PCR original de 153 pb da lugar a dos fragmentos de 76 y 73 pb. Así, el alelo común G genera dos fragmentos de 149 y 4 pb (éste último indetectable), mientras que el alelo mutado T da lugar a dos fragmentos de 76 y 73 pb prácticamente indistinguibles.

### **3.5.5.7 Genotipado de la mutación G1435A (Glu16Lys) en el gen de la proteína C con *FauI***

Al analizar las dianas de restricción en función de la mutación G1435A que produce un cambio de Glutámico a Lisina en el aminoácido 16 situado en el dominio Gla de la proteína C, se observó que la presencia del alelo mutado A elimina una diana de restricción para el enzima *FauI* (SibEnzyme, New England Biolabs), por lo que se utilizó para genotipar las muestras, y cuya diana de restricción es la secuencia:



Una reacción estándar se preparó en un volumen final de 30 µl conteniendo 16 µl de la muestra de PCR del fragmento PC3 y 2 unidades de enzima *FauI* en tampón SE-B (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1mM). La digestión se llevó a cabo en tubos de 0,2 ml de pared fina, incubando durante 3 horas a 55°C en un termociclador. Transcurrido este tiempo, los resultados se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta tras la electroforesis en gel de agarosa al 3% de 8,5 mm de grosor, utilizando como referencia 0,375 µg del marcador de peso molecular *50 bp DNA Ladder*.

En presencia de la mutación, el fragmento de PCR de 308 pb permanece íntegro. Así, el alelo común G genera dos fragmentos de 176 y 132 pb, mientras que el alelo mutado A da lugar a un único fragmento de 308 pb.

### 3.5.6 GENOTIPADO DE POLIMORFISMOS POR HIBRIDACIÓN CON SONDAS ESPECÍFICAS

#### 3.5.6.1 Genotipado de la mutación Factor V Leiden

La presencia del polimorfismo G1691A (Arg506Gln) en el gen del factor V, más conocido como mutación factor V Leiden, se analizó mediante un ensayo comercial de detección (*LightCycler-Factor V Leiden Mutation Detection Kit*, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las muestras de DNA se amplificaron y analizaron en el *LightCycler*, utilizando sondas específicas para la hibridación de cada uno de los genotipos.

#### 3.5.6.2 Genotipado del polimorfismo G20210A en el gen de la protrombina

La presencia del polimorfismo G20210A en el gen de la protrombina se analizó mediante un ensayo comercial de detección (*LightCycler Prothrombin-G20210A Mutation Detection Kit*, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las muestras de DNA se amplificaron y analizaron en el *LightCycler*, utilizando sondas específicas para la hibridación de cada uno de los genotipos.

## 3.6 ANÁLISIS COMPUTACIONAL

### 3.6.1 ANÁLISIS DE LOS GENES

Al comenzar a trabajar con genes resulta esencial recabar información sobre numerosos aspectos del gen, como la estructura génica, la proteína que codifica, las funciones que desempeña, las posibles enfermedades con las que se le relaciona, los posibles cambios o mutaciones que han sido descritos en su secuencia, etc. Resulta esencial obtener la información de referencia del gen, resultado de la recopilación y

síntesis de toda la información disponible sobre el mismo, y no trabajar sobre la base de información parcial publicada por grupos de investigación individuales.

En un primer paso debemos identificar el nombre oficial con que se conoce al gen, lo cual debe buscarse en la base de datos del Comité correspondiente para cada organismo, en este caso el *Human Gene Nomenclature Committee* (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>).

Una vez conocemos la nomenclatura oficial del gen, la fuente de información más completa es la página del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) **LocusLink** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/index.html>). LocusLink organiza la información disponible en bases de datos públicas y de otros grupos dentro del NCBI, para proporcionar información genómica desde un punto de vista centrado en un solo locus.

LocusLink proporciona información sobre la nomenclatura oficial y los diferentes símbolos alternativos y alias con los que se conoce a un gen; accesos a las secuencias de referencia y a un conjunto de las secuencias nucleotídicas y de proteínas más representativas del locus; información sobre la estructura intrón-exón de los genes, mostrando un alineamiento entre el mRNA y la secuencia genómica del gen; información sobre la función del gen, incluyendo una descripción de los diferentes dominios estructurales de la proteína para la que codifica y variantes generadas por *splicing* alternativo; información sobre el grado de homología con otros genes; información sobre mapas cromosómicos y citogenéticos, así como los marcadores genéticos (STSs) asociados al locus; información sobre posibles fenotipos causantes de enfermedades; información sobre los diferentes SNPs (402) y mutaciones que han sido descritos en las bases de datos para el gen y, finalmente, proporciona enlaces a bases de datos y páginas web relacionadas que aportan información adicional.

La información aportada por la página Locus Link resulta complementaria a la información facilitada por la base de datos **RefSeq** (403) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/refseq.html>). El proyecto de las secuencias de referencia (RefSeq) del NCBI, proporciona secuencias de referencia estándares para cromosomas, RNAs y proteínas, y sirve como referencia estable para la caracterización génica, el análisis de mutaciones, estudios de expresión y para el descubrimiento de polimorfismos. RefSeq es una base de datos que aporta información no redundante sobre secuencias de referencia, ya que es producto de una recopilación de todo el conocimiento disponible sobre un único gen, de manera similar a un artículo de revisión.



### 3.6.2 ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS CEBADORES

La mayor parte de los cebadores empleados se diseñaron utilizando el programa informático **Oligo 4.0**. A continuación se analizaron las características de su secuencia y la compatibilidad de cada pareja con los programas **Oligo Calculator** (<http://micro.nwfsc.noaa.gov/protocols/oligoTMcalc.html>) y **Oligo Properties Calculator** (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>).

Tras diseñar los cebadores, comprobamos que no presentaban un grado de homología considerable con ninguna otra región del genoma humano para asegurar la amplificación específica de la región deseada. Para ello, realizamos una búsqueda en todas las bases de datos de secuencias disponibles en la web mediante el programa **BLAST** (378, 379) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) comparando la secuencia de cada uno de los cebadores por separado.

### 3.6.3 BÚSQUEDA DE DIANAS DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Tras la identificación de un polimorfismo mediante la secuenciación de un fragmento génico amplificado por PCR, debe diseñarse una estrategia alternativa a la secuenciación para poder genotipar las muestras de los pacientes y controles con la misma fiabilidad y, al mismo tiempo, que permita analizar gran número de muestras de manera rápida, sencilla y económica.

La estrategia inicial consistió en la búsqueda de potenciales dianas de enzimas de restricción que hubieran sido modificadas por la presencia o ausencia del alelo mutado del polimorfismo. Este análisis se llevó a cabo mediante el programa **WebCutter 2.0** (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>) y la base de datos de información sobre enzimas de restricción y proteínas relacionadas **REBASE** (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>).

En aquellos casos en los que se hubiera creado o eliminado una diana de restricción, y los tamaños de los fragmentos resultantes pudieran ser discriminados con claridad, se optimizó el protocolo para llevar a cabo el genotipado de las muestras mediante la digestión de la muestra de PCR correspondiente al fragmento génico amplificado que contiene el polimorfismo.

### 3.6.4 BÚSQUEDA DE DIANAS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Una vez identificada la existencia de un polimorfismo en la secuencia de DNA que codifica para un gen, analizamos si la presencia del alelo mutado podría tener algún efecto sobre la tasa de transcripción del gen ejerciendo un papel modulador de la regulación de la transcripción del mismo.

Para ello realizamos una búsqueda de la presencia de potenciales sitios de unión de factores de transcripción, y analizamos si la presencia del alelo mutado elimina o genera potenciales dianas para algún factor de transcripción. Esta búsqueda se llevó a cabo mediante el programa **MatInspector 7.2** (404) (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html-transfac>).

### 3.6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables continuas están expresadas como media y desviación estándar (DE) o como mediana y rango, en función de su distribución.

Las frecuencias alélicas se calcularon mediante recuento genético.

Todas las características clínicas de los pacientes y controles, excepto la edad, se compararon utilizando el ensayo de la  $X^2$  con 1 grado de libertad. La edad fue analizada mediante un ensayo de ANOVA.

La significación de las diferencias en los niveles de las variables cuantitativas comparadas entre dos grupos distintos, fue analizada mediante el ensayo de la t de Student o el de Kruskal-Wallis seguido por el ensayo de Mann-Witney en aquellos casos en los que las diferencias entre las variables fueron significativas; el análisis se realizó siguiendo las recomendaciones del paquete estadístico en función del tamaño de la población y de su distribución. Cuando se analizaron las diferencias de estos parámetros entre más de dos grupos distintos, se empleó el ANOVA de una cola.

Los niveles de significación de las correlaciones entre las variables, se analizaron mediante el análisis de regresión lineal de Pearson o con el ensayo de Spearman.

Para identificar posibles asociaciones entre los genotipos o haplotipos y el TEV, se empleó un análisis de regresión logística. Para determinar el porcentaje de varianza en los niveles de APC y de sEPCR explicado por los distintos genotipos, se empleó un modelo de regresión múltiple. En los análisis de regresión logística y regresión múltiple,

## **Mutaciones en el Sistema de la proteína C** \_\_\_\_\_

la edad y los niveles de proteína C y APC fueron transformados en valores logarítmicos a causa del sesgo.

Los Odds ratio (OR), como medida del riesgo relativo, y los intervalos de confianza al 95% (IC 95%) se calcularon de acuerdo con Wolf (405).

Un valor de  $p \leq 0,05$  fue considerado como estadísticamente significativo.

Todos estos análisis se realizaron empleando el paquete estadístico SPSS 11.5 para Windows (SPSS Inc.).

## **4. RESULTADOS**

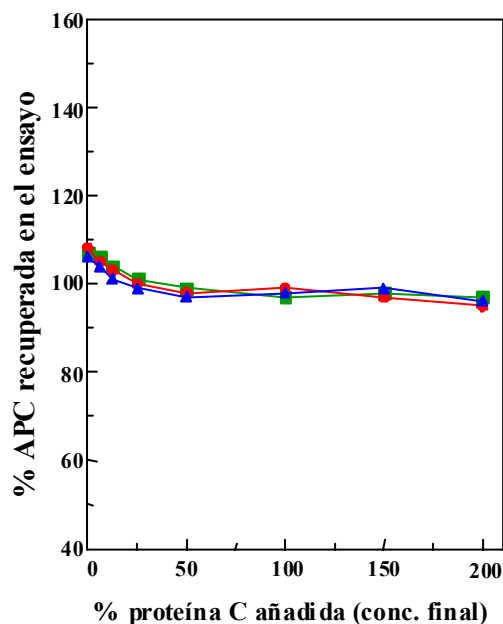


#### 4.1 EVALUACIÓN DEL ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE APC CIRCULANTE

La adición de APC al plasma, *in vitro*, resultó en la formación de complejos con sus inhibidores presentes en el plasma, el PCI, la  $\alpha_1$ AT, la  $\alpha_2$ -macroglobulina y la  $\alpha_2$ -antiplasmina, los cuales pueden ser detectados mediante ensayos específicos (359, 406, 407). Sin embargo, en presencia de heparina, más del 95% de la APC añadida al plasma forma complejos con el PCI (116). Éste es el fundamento del ensayo de APC utilizado en este estudio. La heparina añadida al anticoagulante en el momento de la toma de muestra asegura que casi toda la APC circulante presente en el plasma se acomplejará de forma irreversible al PCI circulante y podrá ser determinada como complejos APC:PCI. Asimismo, una mínima cantidad de APC (< 3%) es recuperada en forma de complejos APC: $\alpha_1$ AT. Aunque ambos tipos de complejos pueden ser determinados mediante ensayos tipo ELISA específicos (115, 116, 361), los cuales pueden ser utilizados para medir la concentración de los complejos APC:inhibidor tanto *in vitro* como *in vivo* (89, 115-117, 359, 361), en el presente estudio hemos simplificado el ensayo de APC midiendo únicamente los niveles de APC:PCI.

##### 4.1.1 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA C EN EL ENSAYO DE APC

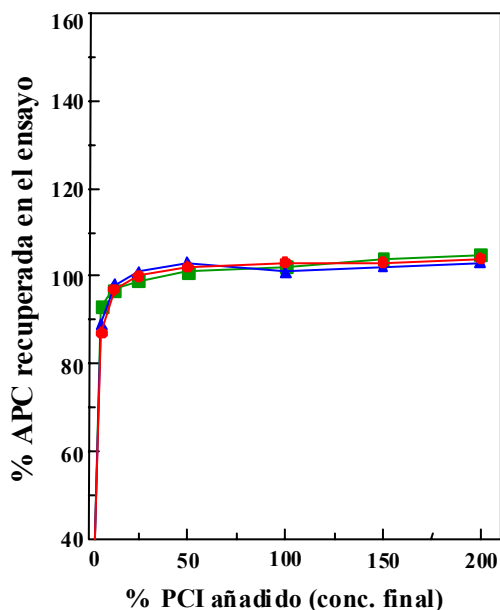
Puesto que el ensayo de APC se basa en un ensayo tipo ELISA en el que el anticuerpo de captura es un anticuerpo anti-proteína C, estudiamos si la variación en los niveles plasmáticos de proteína C interfería en la captura de los complejos APC:inhibidor, lo cual afectaría al ensayo de APC. Para ello se añadieron diferentes cantidades de proteína C purificada a muestras de plasma deficiente en proteína C. Las mezclas se incubaron con APC y heparina y seguidamente se determinaron los complejos APC:PCI. Como se observa en la *Figura 4.1*, concentraciones de proteína C plasmática entre un 25% y un 200% del nivel normal de proteína C no influyeron de forma significativa en la recuperación de APC en el ensayo.



**Figura 4.1. Influencia de los niveles de proteína C en el ensayo de APC.** Se incubaron 100  $\mu$ l de plasma deficiente en proteína C durante 10 minutos a 37°C con 5  $\mu$ l de diferentes concentraciones de proteína C purificada para alcanzar las concentraciones finales indicadas (% en plasma normal). A continuación, las mezclas se incubaron durante 30 minutos a 37°C con 5  $\mu$ l de APC a diferentes concentraciones para alcanzar las concentraciones finales indicadas, en presencia de 10 U/ml de heparina. Finalmente se midieron los complejos APC:PCI formados. ●, 1 ng/ml de APC; ▲, 20 ng/ml de APC; ■, 100 ng/ml de APC.

### 4.1.2 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE PCI EN EL ENSAYO DE APC

Puesto que el ensayo de APC depende de la capacidad de la APC circulante para, en presencia de heparina exógena, acomplejarse totalmente con el PCI plasmático, una disminución significativa de los niveles plasmáticos de PCI podría dar lugar a una subestimación de los niveles de APC circulante. Por lo tanto, para estudiar la influencia de los niveles plasmáticos de PCI en el ensayo de APC, añadimos diferentes cantidades de PCI purificado a plasma deficiente en PCI, y las muestras fueron incubadas con APC y heparina. Seguidamente se midieron los complejos APC:PCI. Como puede verse en la *Figura 4.2*, solamente concentraciones plasmáticas de PCI por debajo del 10% (0,5  $\mu$ g/ml) del valor presente en plasma humano normal (5  $\mu$ g/ml) dieron lugar a una reducción en la recuperación de APC.

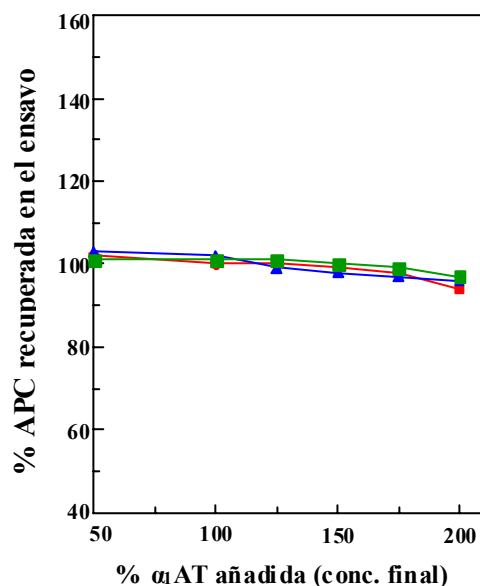


**Figura 4.2. Influencia de los niveles del inhibidor de proteína C (PCI) en el ensayo de APC.** Se incubó 100  $\mu$ l de plasma deficiente en PCI durante 10 minutos a 37°C con 5  $\mu$ l de diferentes concentraciones de PCI purificado para alcanzar las concentraciones finales indicadas (% en plasma normal). A continuación, las mezclas se incubaron durante 30 minutos a 37°C con 5  $\mu$ l de APC a diferentes concentraciones para alcanzar las concentraciones finales indicadas, en presencia de 10 U/ml de heparina. Finalmente, se midió los complejos APC:PCI formados. ●, 1 ng/ml de APC; ▲, 20 ng/ml de APC; ■, 100 ng/ml de APC.

#### 4.1.3 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE $\alpha_1$ AT EN EL ENSAYO DE APC

El inhibidor de las serín proteasas  $\alpha_1$ AT es una proteína reactante de fase aguda que, en determinadas circunstancias, puede alcanzar una concentración plasmática de hasta tres veces el nivel basal. Para comprobar si un incremento en los niveles plasmáticos de  $\alpha_1$ AT podría tener un efecto sobre la recuperación de APC en el ensayo, incubamos muestras de plasma humano normal con cantidades crecientes de  $\alpha_1$ AT purificada. La adición de concentraciones crecientes de  $\alpha_1$ AT purificada hasta un 200% de la del plasma humano normal, no modificó significativamente la cantidad total de APC recuperada en el ensayo, puesto que los valores oscilaron entre el 102% y el 94%.





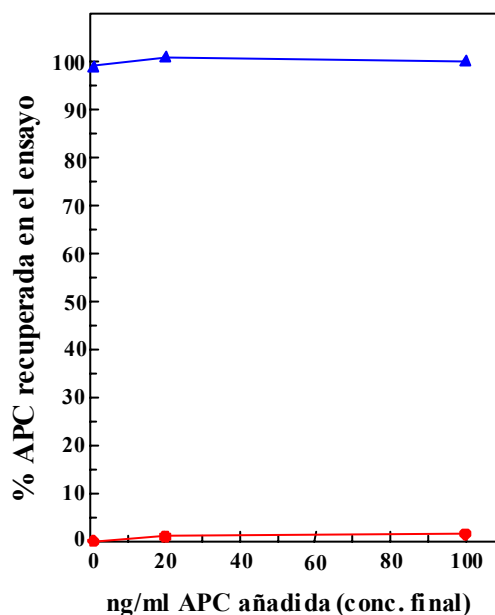
**Figura 4.3. Influencia de los niveles de  $\alpha_1$ -antitripsina ( $\alpha_1$ AT) en el ensayo de APC.** 50  $\mu$ l de plasma normal se incubó durante 15 minutos a 37°C con 50  $\mu$ l de diferentes concentraciones de  $\alpha_1$ AT purificada para alcanzar las concentraciones finales indicadas (% en plasma normal). A continuación, las mezclas se incubaron durante 30 minutos a 37°C con 10  $\mu$ l de APC a diferentes concentraciones para alcanzar las concentraciones finales indicadas, en presencia de 90 U/ml de heparina. Finalmente, se midieron los complejos APC:PCI formados. ●, 1 ng/ml de APC; ▲, 20 ng/ml de APC; ■, 100 ng/ml de APC.

#### 4.1.4 ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN DE APC EXTRÍNSECA AÑADIDA AL PLASMA

A su vez, determinamos la recuperación de la APC extrínseca añadida al plasma de 30 pacientes con TEV. En todos los casos, la APC añadida al plasma en presencia de heparina hasta alcanzar una concentración final de 0,3, 0,6 o 0,9 ng/ml, fue recuperada entre el 91% y el 108%.

#### 4.1.5 ESTUDIO DEL BLOQUEO DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS *IN VITRO* POR EL CÓCTEL DE INHIBIDORES

Para valorar si los inhibidores benzamidina y PPACK, utilizados en el ensayo de APC, bloquean de forma efectiva la formación de complejos *in vitro* entre la APC y el PCI, se añadió una solución de APC purificada a las muestras de dos pacientes recolectadas en presencia del cóctel de inhibidores, y se midieron los complejos APC:PCI. Como se puede observar en la *Figura 4.4*, se recuperó menos de un 3% de la APC extrínseca añadida a las muestras.



**Figura 4.4.** Estudio del bloqueo de la formación de complejos APC:PCI *in vitro* por el cóctel de inhibidores utilizado en el ensayo de APC. A un volumen de sangre normal se añadió el cóctel de inhibidores (benzamidina y PPACK) o tampón, de la misma manera que en el ensayo de APC, y a continuación se incubó la mezcla durante 30 minutos a 37°C con un volumen 1/100 de APC purificada hasta alcanzar las concentraciones finales indicadas, en presencia de 10 U/ml de heparina. Finalmente, se midieron los complejos APC:PCI formados. ●, cóctel de inhibidores; ▲, tampón.

#### 4.2 ESTUDIO DE NIVELES REDUCIDOS DE APC CIRCULANTE COMO FACTOR DE RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA

Con el fin de analizar si los niveles de proteína C activada circulante constituyen un factor de riesgo de trombosis venosa, se midieron los niveles de APC en un grupo de 160 pacientes con historia de TEV y en un grupo control formado por 199 individuos sanos sin historia personal ni familiar de trombosis y de edad y sexo similar al del grupo de pacientes.

La *Figura 4.5* muestra la distribución de los niveles de APC en pacientes y controles.

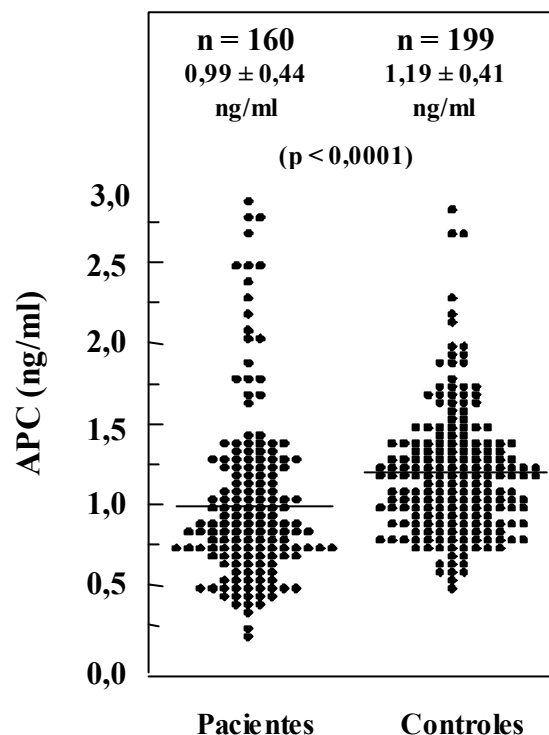


Figura 4.5. Distribución de los niveles de APC circulante en pacientes y controles.

La concentración media de APC ( $\pm$  DE) en los 359 pacientes y controles fue  $1,10 \pm 0,43$  ng/ml. Los niveles de APC presentaban una distribución normal en ambos grupos. Los niveles medios de APC estaban significativamente más bajos en los 160 pacientes ( $0,99 \pm 0,44$  ng/ml) que en los 199 controles ( $1,19 \pm 0,41$  ng/ml) ( $p < 0,0001$ ). Once pacientes (6,9%) presentaban niveles de APC por debajo del valor más bajo del grupo control, 38 pacientes (23,7%) presentaban niveles de APC por debajo del percentil 5% del grupo control ( $< 0,69$  ng/ml), y 57 pacientes (35,6%) presentaban niveles de APC por debajo del percentil 10% del grupo control ( $< 0,77$  ng/ml). Se calcularon los OR crudos para niveles de APC por debajo de diversos puntos de corte. La *Tabla 4.1* muestra los resultados obtenidos. El OR para los individuos con niveles de APC por debajo de 0,98 ng/ml fue de 1,9 (IC 95%: 1,3 – 2,8) y ascendió hasta 4,7 (2,3 – 9,8) para niveles de APC inferiores a 0,69 ng/ml. Al realizar el análisis por separado, en función del sexo, los ORs para hombres y mujeres fueron similares.

**Tabla 4.1. Odds Ratios (IC 95%) para varios puntos de corte de niveles reducidos de APC**

<b>APC (ng/ml)</b>	<b>PACIENTES n (%)</b>	<b>CONTROLES n (%)</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
<b>&lt; 0,69</b>	38 (23,7)	10 (5)	4,7	2,3 – 9,8
<b>&lt; 0,77</b>	57 (35,6)	19 (9,5)	3,7	2,1 – 6,5
<b>&lt; 0,85</b>	72 (45,0)	39 (19,6)	2,3	1,5 – 3,6
<b>&lt; 0,98</b>	90 (56,2)	59 (29,6)	1,9	1,3 – 2,8

La *Tabla 4.2* muestra la prevalencia de los bajos niveles de APC en controles y en pacientes con episodios trombóticos únicos o recurrentes y en pacientes con y sin historia familiar de trombosis. El OR para un episodio de TEV recurrente fue mucho mayor que para un único episodio, mientras que los pacientes con y sin historia familiar de trombosis presentaban ORs similares.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

Tabla 4.2. Prevalencia y OR (IC 95%) para 2 puntos de corte de niveles reducidos de APC en controles (N = 199) y en pacientes con un único episodio de tromboembolismo venoso (n = 131) o recurrente (n = 29), y en pacientes sin (n = 118) o con (n = 42) historia familiar de trombosis.

GRUPO	APC < 0,69 ng/ml		APC < 0,77 ng/ml	
	n (%)	OR (IC 95%)	n (%)	OR (IC 95%)
CONTROLES, n (%)	10 (5)	1*	19 (9,5)	1*
PACIENTES CON UN ÚNICO EPISODIO TEV	28 (21,4)	4,2 (2,0 – 9,0)	43 (32,8)	3,4 (1,9 – 6,2)
PACIENTES CON TEV RECURRENTE	10 (34,5)	6,9 (2,6 – 17,9)	14 (48, 3)	5,1 (2,3 – 11,2)
PACIENTES SIN TROMBOSIS FAMILIAR	27 (22,9)	4,5 (2,1 – 9,7)	43 (36,4)	3,8 (2,1 – 6,9)
PACIENTES CON TROMBOSIS FAMILIAR	11 (26,2)	5,2 (2,1 – 13,1)	14 (33,3)	3,5 (1,6 – 7,5)

\* Grupo de referencia.

### 4.2.1 ESTUDIO DE LA VARIACIÓN LONGITUDINAL DEL NIVEL DE APC

De los 57 pacientes con los niveles más bajos de APC (< 0,77 ng/ml), a 38 de ellos se les realizó una segunda toma de muestra varios meses después de la primera determinación, para volver a medir sus niveles de APC. En 23 de ellos, el nivel de APC volvió a estar por debajo de 0,77 ng/ml, mientras que en 13 de ellos estaba entre 0,77 y 0,98 ng/ml, lo cual todavía confiere a los pacientes un riesgo trombótico significativamente aumentado (OR = 1,9). De los 15 pacientes que mostraron niveles de APC por encima de 0,77 ng/ml en la segunda visita, 11 de ellos fueron estudiados una tercera vez al menos un mes después y 7 de ellos mostraron niveles de APC por debajo de 0,77 ng/ml, mientras que los otros 4 tenían niveles de APC entre 0,77 y 0,98 ng/ml. Por tanto, aunque hubo un aumento significativo en los niveles de APC en algunos pacientes en la segunda visita, el nivel medio de APC de los 38 pacientes en la primera visita ( $0,60 \pm 0,20$  ng/ml) se mantuvo bajo en la segunda ( $0,66 \pm 0,25$  ng/ml) y tercera ( $0,65 \pm 0,24$  ng/ml) visitas.

#### **4.2.2 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA C SOBRE LOS NIVELES DE APC**

Los niveles de APC circulante son proporcionales a los niveles de proteína C totales (365, 408). Aunque en el presente estudio excluimos a todos aquellos pacientes y controles con deficiencias de proteína C de tipo I y tipo II, quisimos descartar la posibilidad de que los niveles de APC reducidos observados en algunos pacientes con TEV fueran debidos a unos niveles moderadamente bajos de proteína C de forma concomitante. Para ello medimos los niveles de proteína C antigénica en todos los pacientes y controles y normalizamos los valores de APC dividiéndolos por la concentración de proteína C total. El valor medio de los ratios APC/proteína C para todos los pacientes y controles fue  $0,96 \pm 0,44$  y  $1,22 \pm 0,38$  ( $p < 0,001$ ), respectivamente. Para los grupos de pacientes y controles con niveles de APC por debajo de  $0,77$  ng/ml, los ratios APC/proteína C correspondientes fueron  $0,59 \pm 0,16$  y  $0,71 \pm 0,10$  ( $p = 0,003$ ), respectivamente; mientras que los ratios APC/proteína C para aquellos pacientes y controles con niveles de APC mayores de  $0,77$  ng/ml fueron de  $1,17 \pm 0,41$  y  $1,22 \pm 0,35$  ( $p = 0,027$ ), respectivamente.

#### **4.2.3 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA GENERACIÓN DE TROMBINA SOBRE LOS NIVELES DE APC**

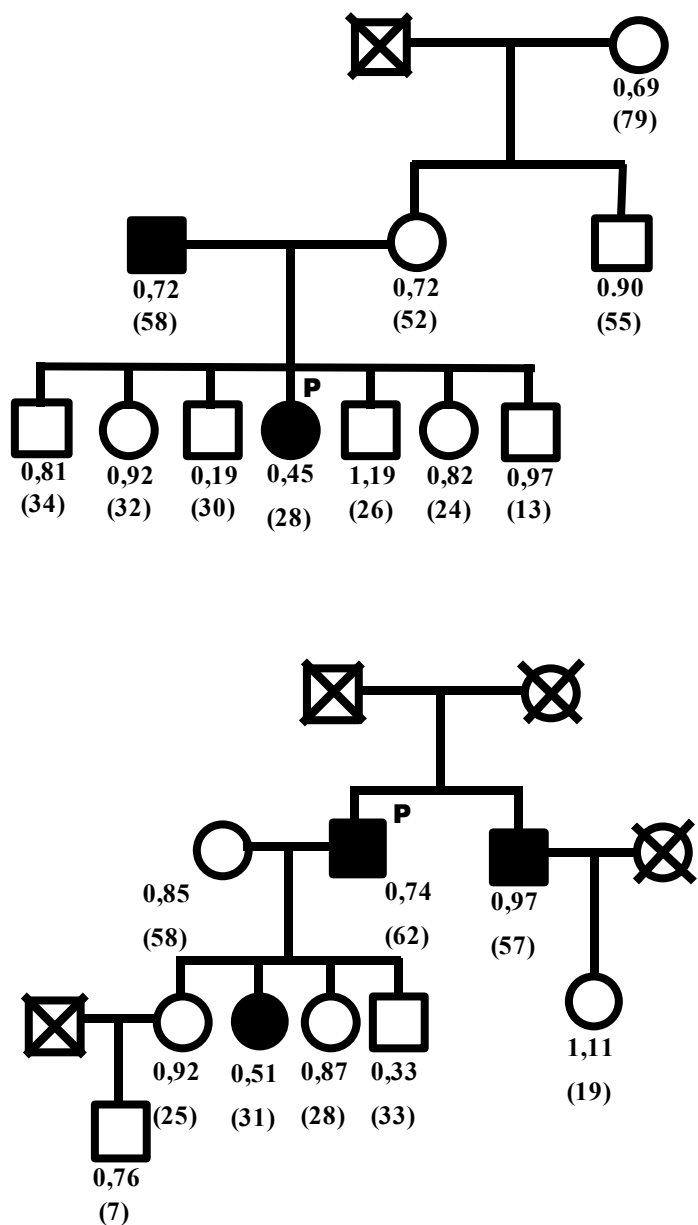
La APC se genera a partir de la activación de la proteína C por la trombina en la superficie de la célula endotelial. Por lo tanto, una reducción en la generación de trombina podría dar lugar a la reducción en los niveles de APC observados en algunos pacientes con TEV. Para comprobarlo medimos la concentración de los fragmentos F1+2 generados durante el proceso de activación de la protrombina, en pacientes y controles. No encontramos diferencias significativas en el nivel medio de F1+2, entre el grupo de pacientes ( $0,87 \pm 0,49$  nM) y el grupo de controles ( $0,83 \pm 0,39$  nM) ( $p = 0,376$ ). Los subgrupos de pacientes con TEV con niveles de APC por debajo de  $0,47$  ng/ml y por debajo de  $0,77$  ng/ml, presentaron unos niveles medios de F1+2 ( $0,81 \pm 0,47$  y  $0,84 \pm 0,45$  nM, respectivamente) similares a los del grupo control ( $p > 0,8$ ).

**4.2.4 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS NIVELES DE PCI Y DE  $\alpha_1$ AT SOBRE LOS NIVELES DE APC**

Un nivel plasmático reducido de PCI, o un nivel elevado de  $\alpha_1$ AT podría dar lugar a falsos niveles de APC reducidos en nuestro ensayo. Por ello, determinamos los niveles de ambos inhibidores en pacientes y controles. El nivel medio ( $\pm$  DE) de PCI funcional en pacientes ( $98\% \pm 23\%$ ; rango: 70% - 139%) fue similar al nivel medio del grupo control ( $99\% \pm 21\%$ ; rango: 69% - 143%) ( $p = 0,985$ ). Asimismo, el nivel medio ( $\pm$  DE) de  $\alpha_1$ AT en pacientes ( $112\% \pm 30\%$ ; rango: 72% - 173%) fue similar al nivel medio del grupo control ( $106\% \pm 29\%$ ; rango: 70% - 170%) ( $p = 0,061$ ).

**4.2.5 ESTUDIO DE LA HEREDABILIDAD DE NIVELES REDUCIDOS DE APC**

Para analizar si los persistentes niveles reducidos de APC observados en algunos pacientes con TEV están genéticamente determinados, llevamos a cabo un estudio familiar en 8 probandos con TEV y niveles de APC por debajo de 0,77 ng/ml. En 4 de las familias, el fenotipo “bajo nivel de APC” parecía ser hereditario, aunque el número de familiares estudiados fue reducido. La *Figura 4.6* muestra los resultados obtenidos en las dos familias más ampliamente estudiadas. En una familia, 5 de los 11 miembros estudiados mostraron niveles de APC por debajo de 0,77 ng/ml, incluyendo a los 2 miembros que habían sufrido episodios trombóticos. En la otra familia, 3 de los 8 miembros estudiados mostraron niveles de APC por debajo de 0,77 ng/ml, incluyendo dos de los tres miembros con historia de TEV.



**Figura 4.6.** Heredabilidad de los niveles reducidos de APC circulante en las familias de 2 probandos (P) con historia de tromboembolismo venoso. Los números hacen referencia al valor del nivel de APC (ng/ml). Los números entre paréntesis indican la edad. Los cuadrados y círculos negros representan los familiares con historia de TEV. El aspa denota los familiares no estudiados.



### **4.3 BÚSQUEDA DE NUEVAS MUTACIONES EN LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C**

Los niveles reducidos de APC, observados en un número significativo de pacientes con TEV, podrían ser debidos a una deficiente generación de APC ocasionada por la presencia de mutaciones en las proteínas que forman el complejo de activación de la proteína C. Por ello, seleccionamos los 26 pacientes con TEV que tenían niveles muy reducidos de proteína C activada circulante, por debajo del percentil 10% del grupo control, de forma persistente. A este grupo de pacientes se les realizó un amplio estudio genético consistente en la secuenciación de la región codificante, así como parte de las regiones reguladoras e intrónicas flanqueantes, de los cuatro genes que codifican para las proteínas que forman el complejo de activación de la proteína C: EPCR, trombomodulina, protrombina y proteína C. Para ello secuenciamos los diferentes fragmentos en los que dividimos estos cuatro genes (ver Material y Métodos) con el fin de identificar la presencia de posibles mutaciones en las regiones codificantes o en las regiones intrónicas que flanquean a los exones, potencialmente responsables de los bajos niveles de APC circulante que muestran estos pacientes.

Tras secuenciar los diferentes fragmentos en los que dividimos los cuatro genes estudiados, EPCR, trombomodulina, protrombina y proteína C, identificamos y analizamos las diferentes mutaciones presentes en dichos fragmentos y seleccionamos aquellas que, *a priori*, pudieran tener una mayor relevancia sobre la regulación del gen o la funcionalidad de la proteína. Seguidamente, diseñamos la estrategia para ampliar el estudio de cada una de ellas genotipando un mayor número de muestras mediante análisis de restricción o SSCP. Aquellas muestras que mostraron un patrón de bandas anormal fueron secuenciadas con el fin de comprobar su genotipo. Aquellas mutaciones para las que el diseño de una estrategia de análisis alternativo no fue posible, el genotipo se determinó mediante secuenciación directa de las mismas.

#### **4.3.1 MUTACIONES EN EL GEN DEL EPCR**

##### **4.3.1.1 Nuevas mutaciones encontradas en el gen del EPCR**

La *Tabla 4.3* muestra las nuevas mutaciones encontradas en el gen del EPCR de los 26 pacientes con TEV estudiados, así como el genotipo obtenido para cada una de ellas.

Tabla 4.3. Mutaciones identificadas en los 26 pacientes con los niveles más bajos de APC, al secuenciar el gen del EPCR.

PACIENTES CON TEV	T2532C (intrón I)	G2876A (intrón II)	G2897A (intrón II)	T3997C (intrón II)	A4600G (exón 4)	G4678C (3' UTR)
APC 113	TC	GG	GA	TC	AA	GC
APC 114	TT	GG	GG	TT	AA	GG
APC 115	TC	GG	GA	TC	AA	GC
APC 117	TC	GG	GA	TC	AA	GC
APC 118	TT	GA	GG	TT	AA	GG
APC 121	TC	GG	GA	TC	AA	GC
APC 122	TC	GG	GA	TC	AA	GC
APC 123	TC	GG	GA	TC	AA	GC
APC 124	TT	GG	GG	TT	AA	GG
APC 125	CC	GG	AA	CC	AA	CC
APC 154	CC	GG	AA	CC	AA	CC
APC 176	TC	GG	GA	TC	AA	GC
APC 180	TT	GG	GG	TT	AA	GG
APC 195	TC	GG	GA	TC	AG	GC
APC 200	TC	GG	GA	TC	AA	GC
APC 215	TC	GG	GA	TC	AA	GC
APC 238	TT	GG	GG	TT	AA	GG
APC 248	TC	GG	GA	TC	AA	GC
APC 250	TT	GA	GG	TT	AA	GG
APC 270	TC	GG	GA	TC	AA	GC
APC 275	TT	GG	GG	TT	AA	GG
APC 282	TC	GG	GA	TC	AA	GC
APC 285	TT	GA	GG	TT	AA	GG
APC 335	TT	GG	GG	TT	AA	GG
APC 348	CC	GG	AA	CC	AA	CC
APC 379	TC	GG	GA	TC	AA	GC

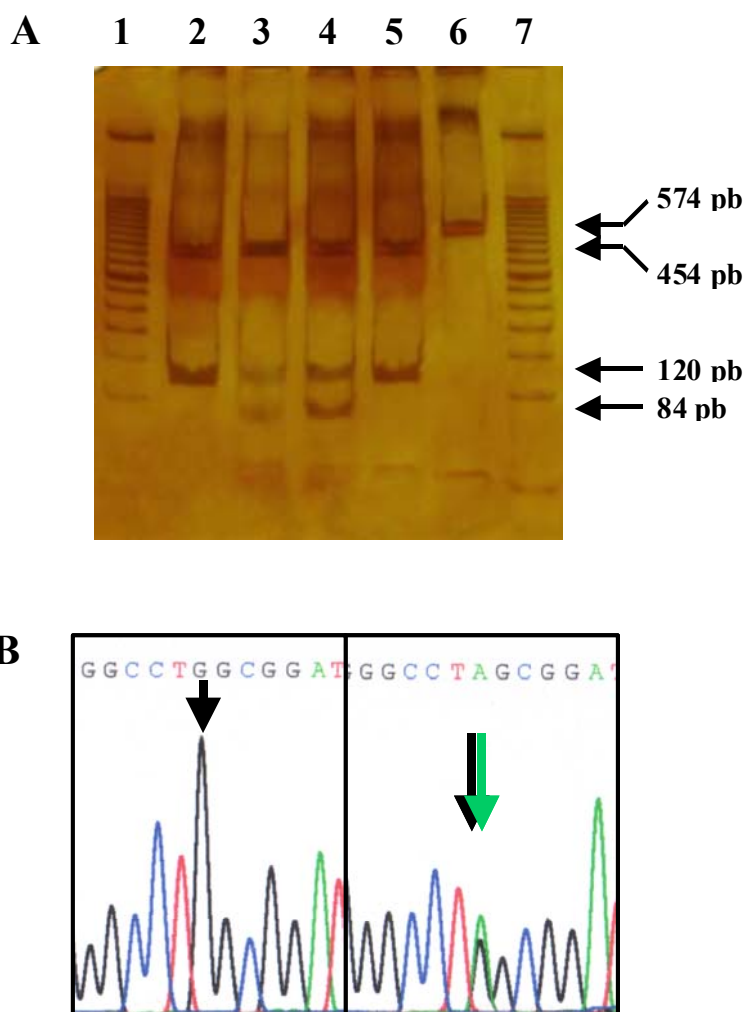
Como puede apreciarse en la *Tabla 4.3*, los polimorfismos T2532C, G2897A, T3997C y G4678C están en completo desequilibrio de ligamiento. Inicialmente genotipamos por secuenciación directa unos 100 individuos, con el fin de confirmar que realmente estos polimorfismos estaban en desequilibrio de ligamiento. Una vez confirmado dicho desequilibrio, la caracterización posterior de los 4 polimorfismos se realizó mediante el estudio del polimorfismo G4678C.

### 4.3.1.2 Caracterización de las mutaciones encontradas

Para llevar a cabo un estudio más amplio de los polimorfismos más relevantes identificados en el gen del EPCR, desarrollamos diferentes estrategias adecuadas para el análisis de cada uno de ellos.

#### 4.3.1.2.1 Análisis de la mutación G2876A en el gen del EPCR

El genotipado del polimorfismo G2876A, situado en el intrón II del gen del EPCR, se llevó a cabo mediante análisis de restricción de las muestras con el enzima *XspI*, ya que la presencia del alelo mutado A genera una segunda diana de restricción para este enzima. Tras incubar con el enzima los fragmentos amplificados por PCR, las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida, el cual se tiñó posteriormente con plata para visualizar los productos de la digestión. En la *Figura 4.7* se pueden observar los resultados obtenidos tras la digestión de las muestras, así como el cromatograma de secuenciación. En ausencia de la mutación (alelo G), el fragmento de 574 pb amplificado presenta una diana para *XspI*, generando 2 fragmentos de 454 y 120 pb. En presencia de la mutación (alelo A), se genera una segunda diana de restricción en el fragmento de 120 pb, el cual se escinde en dos fragmentos de 84 y 36 pb, éste último no visible en las condiciones de electroforesis utilizadas.



**Figura 4.7. Genotipado del polimorfismo G2876A en el gen del EPCR.** *A:* Genotipado mediante análisis de restricción con el enzima *XspI*. Los pocillos 1 y 7 contienen el marcador de peso molecular de 50 pares de bases. Los pocillos 2 y 5 contienen muestras de genotipo GG, cuyo patrón de bandas es de 454 + 120 pb. Los pocillos 3 y 4 contienen muestras de genotipo GA, cuyo patrón de bandas es de 454 + 120 + 84 + 36 pb, siendo esta última indetectable. El pocillo 6 contiene, como control, una muestra amplificada sin digerir y presenta, por tanto, una única banda de 574 pb que corresponde al tamaño del fragmento de PCR original. No encontramos ningún paciente ni control con genotipo AA. *B:* Patrón de secuenciación de las muestras. El primer cromatograma corresponde a una muestra de genotipo normal GG, y el segundo corresponde a una muestra heterocigota GA.

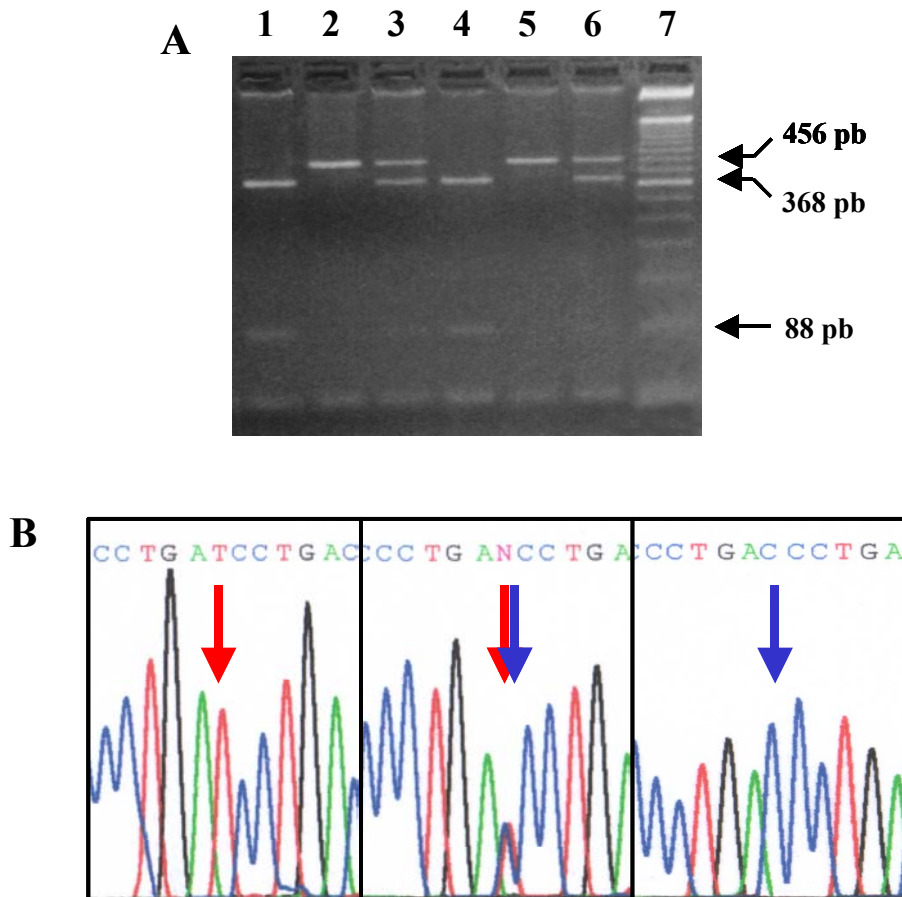
#### 4.3.1.2.2

#### Análisis de la mutación T3997C en el gen del EPCR

El genotipado del polimorfismo T3997C, situado en el intrón II del gen del EPCR, se llevó a cabo mediante análisis de restricción de las muestras con el enzima *MboI*, ya que la presencia del alelo mutado C elimina una diana de restricción para este enzima. Seguidamente, las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos de la digestión. En la *Figura 4.8* se pueden observar los

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

resultados obtenidos tras la digestión de las muestras, así como el cromatograma de secuenciación. En presencia del alelo común (alelo T), el fragmento original de 456 pb se escinde en dos fragmentos de 368 y 88 pb, mientras que en presencia de la mutación (alelo C), el fragmento de 456 pb permanece íntegro.

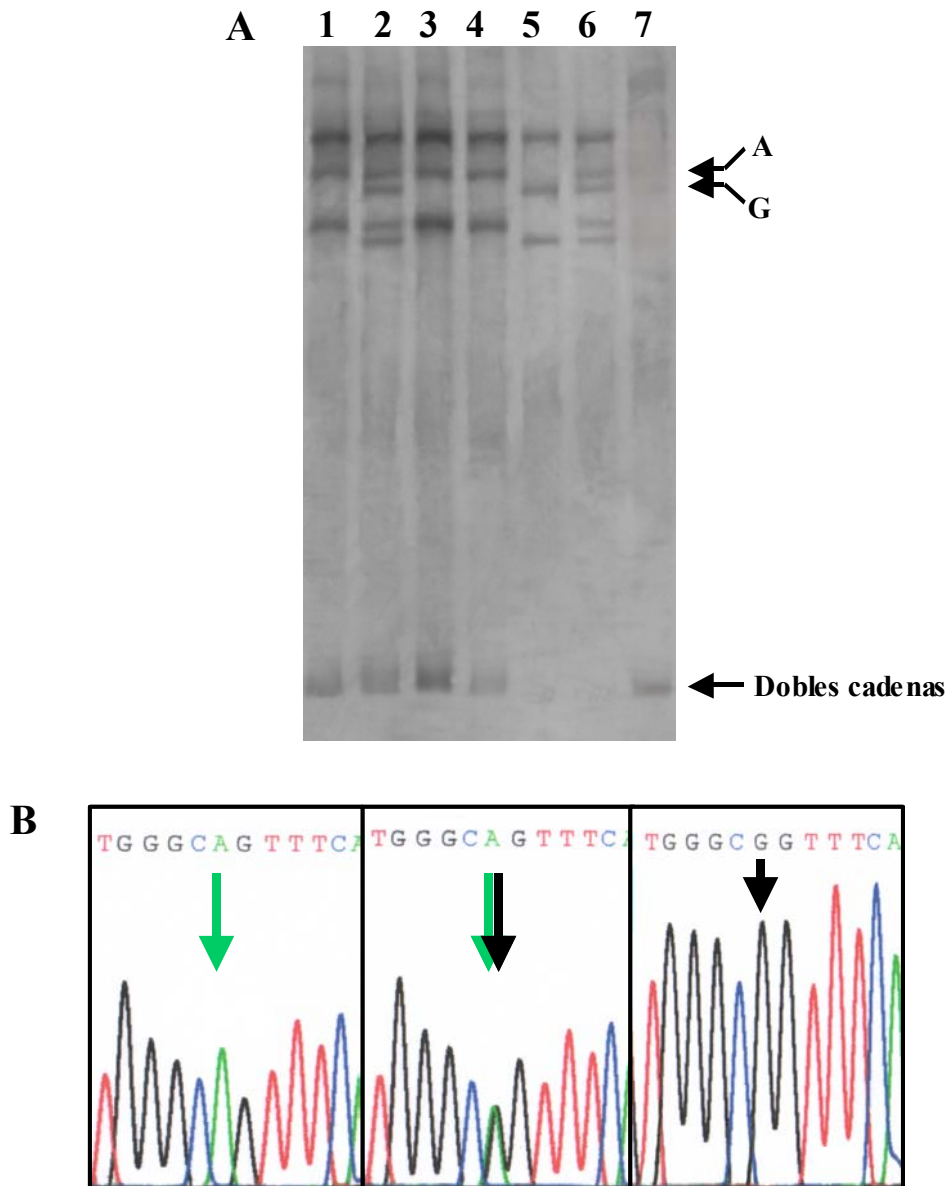


**Figura 4.8. Genotipado del polimorfismo T3997C en el gen del EPCR.** **A:** Genotipado mediante análisis de restricción con el enzima *MboI*. Los pocillos 1 y 4 contienen muestras de genotipo normal TT, cuyo patrón de bandas es de 368 + 88 pb, esta última de débil intensidad. Los pocillos 2 y 5 contienen muestras de genotipo CC homocigoto para la mutación, cuyo patrón es una única banda de 456 pb que corresponde al tamaño del fragmento de PCR original. Los pocillos 3 y 6 contienen muestras de genotipo heterocigoto TC, cuyo patrón de bandas es de 456 + 368 + 88 pb, siendo esta última indetectable en las muestras con este genotipo. El pocillo 7 contiene el marcador de peso molecular de 50 pares de bases. **B:** Patrón de secuenciación de las muestras. El primer cromatograma corresponde a una muestra de genotipo normal TT, el segundo corresponde a una muestra heterocigota TC y el tercero corresponde a una muestra de genotipo mutado CC.

**4.3.1.2.3**

**Análisis de la mutación A4600G (Ser219Gly) en el gen del EPCR**

El genotipado del polimorfismo A4600G, que produce un cambio de aminoácido de Serina a Glicina en el residuo 219 situado en la región transmembrana del EPCR, se llevó a cabo mediante análisis por SSCP de las muestras, puesto que la presencia de la mutación no genera ni modifica ninguna diana de restricción. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida, el cual fue posteriormente teñido con plata para visualizar las bandas resultantes. La presencia del alelo mutado 4678C, el cual está localizado en el mismo fragmento génico amplificado, no dio lugar a un patrón de bandas anormal en las condiciones empleadas en el ensayo, lo cual indica que las bandas anormales observadas en este fragmento amplificado son únicamente debidas a la mutación 4600G. En la *Figura 4.9* se muestran los resultados obtenidos tras la electroforesis de las muestras, así como el cromatograma de secuenciación.



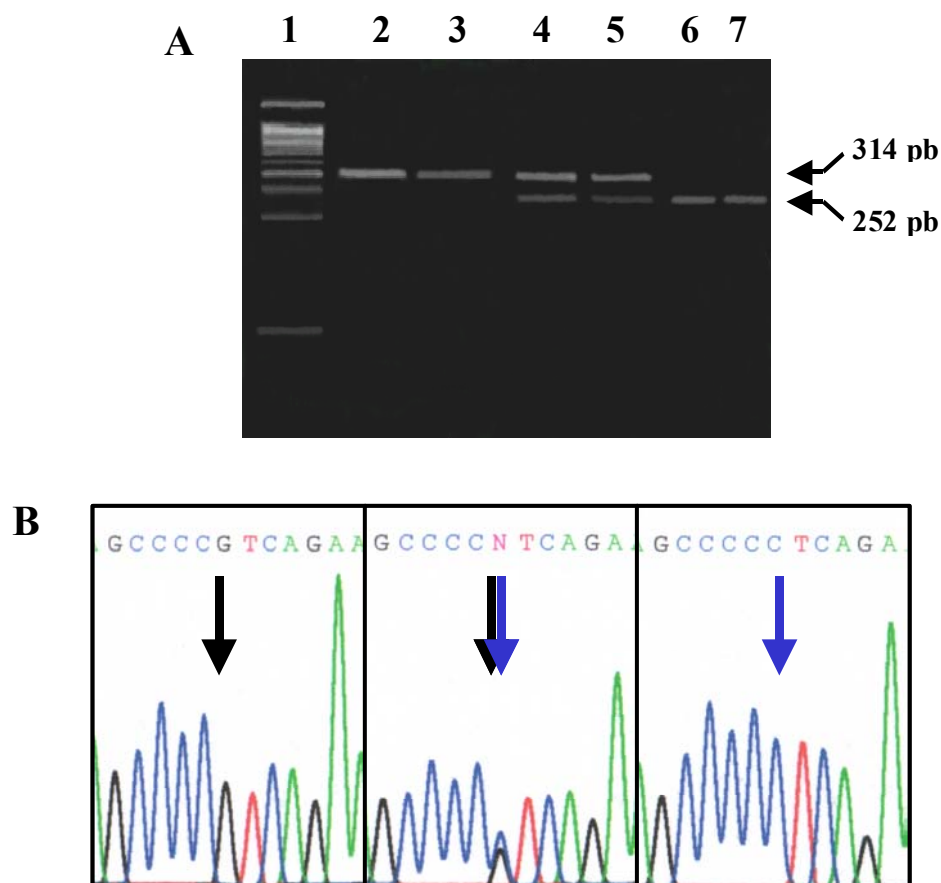
**Figura 4.9. Genotipado del polimorfismo A460G en el gen del EPCR.** *A:* Genotipado mediante SSCP. Los pocillos 1, 3 y 4 contienen muestras de genotipo AA. Los pocillos 2 y 6 contienen muestras de genotipo AG. El pocillo 5 contiene una muestra de genotipo GG. El pocillo 7 contiene como control una muestra amplificada sin desnaturalizar. *B:* Patrón de secuenciación de las muestras. El primer cromatograma corresponde a una muestra de genotipo normal AA, el segundo corresponde a una muestra heterocigota AG y el tercero corresponde a una muestra de genotipo mutado GG.

#### 4.3.1.2.4

#### Análisis de la mutación G4678C en el gen del EPCR

El genotipado del polimorfismo G4678C situado en la región 3' no traducida del gen del EPCR, se llevó a cabo mediante el análisis de restricción de las muestras con el enzima *DdeI*, ya que la presencia del alelo mutado C genera una diana de restricción para este enzima. Seguidamente las muestras se sometieron a electroforesis en gel de

agarosa para visualizar los productos de la digestión. En la *Figura 4.10* se muestran los resultados obtenidos tras la digestión de las muestras, así como el cromatograma de secuenciación. En presencia de la mutación (alelo C), el fragmento original de 314 pb se escinde en dos fragmentos de 252 y 62 pb.



**Figura 4.10. Genotipado del polimorfismo G4678C en el gen del EPCR.** *A:* Genotipado mediante análisis de restricción con el enzima *DdeI*. El pocillo 1 contiene el marcador de peso molecular  $\phi 174/HaeIII$ . Los pocillos 2 y 3 contienen muestras de genotipo GG, cuyo patrón es una única banda de 314 pb que corresponde al tamaño del fragmento de PCR original. Los pocillos 4 y 5 contienen muestras de genotipo GC, cuyo patrón de bandas es de 314 + 252 + 62 pb, esta última inapreciable en el gel. Los pocillos 6 y 7 contienen muestras de genotipo CC, cuyo patrón de bandas es de 252 + 62 pb, esta última inapreciable. *B:* Patrón de secuenciación de las muestras. El primer cromatograma corresponde a una muestra de genotipo normal GG, el segundo corresponde a una muestra heterocigota GC y el tercero corresponde a una muestra de genotipo mutado CC.



**4.3.1.3 Análisis de la asociación de las mutaciones en el gen del EPCR con el riesgo de trombosis**

Una vez dispusimos de estrategias adecuadas para caracterizar las mutaciones encontradas, comprobamos el genotipo de los 26 pacientes con TEV y con los niveles más bajos de APC estudiados inicialmente mediante secuenciación directa, y ampliamos el estudio a un mayor número de pacientes con TEV y de controles. A su vez, en aquellas muestras que fueron secuenciadas se analizó el genotipo de todas las mutaciones previamente descritas en la bibliografía, comprendidas en el fragmento correspondiente.

**Tabla 4.4. Frecuencia de las mutaciones identificadas en el gen del EPCR.**

MUTACIÓN	LOCALIZACIÓN EN EL GEN	FRECUENCIAS ALÉLICAS n (%)		
		PACIENTES TEV	CONTROLES	OR (IC 95%)
T2532C	intrón I	T 512 (56,1 %)	T 426 (51 %)	0,812 (0,672 – 0,980)*
		C 400 (43,9 %)	C 410 (49 %)	
delG2847	intrón II	G 102 (100 %)	G 99 (99 %)	0,324 (0,013 – 8,044)
		delG 0 (0 %)	delG 1 (1 %)	
G2876A	intrón II	G 729 (96,7 %)	G 401 (96,9 %)	1,058 (0,535 – 2,091)
		A 25 (3,3 %)	A 13 (3,1 %)	
G2897A	intrón II	G 512 (56,1 %)	G 426 (51 %)	0,812 (0,672 – 0,980)*
		A 400 (43,9 %)	A 410 (49 %)	
T3997C	intrón II	T 512 (56,1 %)	T 426 (51 %)	0,812 (0,672 – 0,980)*
		C 400 (43,9 %)	C 410 (49 %)	
A4600G Ser219Gly	exón 4	A 801 (91 %)	A 696 (91,1 %)	1,009 (0,719 – 1,418)
		G 79 (9 %)	G 68 (8,9 %)	
G4678C	exón 4 3' UTR	G 512 (56,1 %)	G 426 (51 %)	0,812 (0,672 – 0,980)*
		C 400 (43,9 %)	C 410 (49 %)	

\* p = 0,03

Como se observa en la *Tabla 4.4*, solamente los polimorfismos T2532C, G2897A, T3997C y G4678C en completo desequilibrio de ligamiento mostraron diferencias significativas o próximas a la significación en la distribución alélica entre pacientes y controles. El polimorfismo A4600G no parece estar asociado con un mayor riesgo trombótico, puesto que las frecuencias alélicas en pacientes y controles son muy

similares. Pero, al estar situado en la región transmembrana del receptor y originar un cambio de aminoácido de Serina a Glicina en la secuencia de la proteína, decidimos estudiarlo con mayor profundidad. Así, seleccionamos los polimorfismos A4600G y G4678C (como representante del conjunto de polimorfismos en desequilibrio de ligamiento) para estudiar su posible asociación con los niveles de APC y el riesgo de trombosis.

Finalmente, se han descrito otras mutaciones en el gen del EPCR asociadas con trombosis venosa y/o arterial. En diversos estudios, se han identificado mutaciones en la región promotora del gen (409-411), pero en nuestro estudio no hemos analizado esta región reguladora. Asimismo, se han descrito mutaciones en zonas centrales del intrón I e intrón II y en una zona distal de la región 3' UT, no analizadas en nuestro estudio (411, 412). A su vez, se ha descrito la existencia de dos mutaciones situadas en el exón 3 del gen del EPCR: la mutación C4237T que no produce cambio de aminoácido (413), y el polimorfismo C4031T (Arg113Cys) que no modifica las propiedades del receptor (414). Al realizar la secuenciación directa de diversas muestras, no se encontró ningún paciente ni control que fuera portador de las mismas, lo cual sugiere que son mutaciones de muy baja frecuencia. Finalmente, se ha descrito la presencia de una inserción de 23 pb en el nucleótido 4031 que genera un codón de parada prematuro, dando lugar a la síntesis de una proteína truncada no funcional que carece de parte de la región extracelular, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática (413). En nuestro estudio, únicamente encontramos la mutación en 1/186 controles y en ninguno de los 251 pacientes con TEV estudiados, por lo que no parece estar asociada con un mayor riesgo trombótico. Se han realizado numerosos estudios para analizar su posible relación con la trombosis, pero los resultados son contradictorios, posiblemente debido a la baja incidencia de la mutación. (Para mayor información sobre estos estudios realizados de las mutaciones en el gen del EPCR, consultar el apartado 5.3.1 de la Discusión).

#### **4.3.2 MUTACIONES EN EL GEN DE LA TROMBOMODULINA**

##### **4.3.2.1 Nuevas mutaciones encontradas en el gen de la trombomodulina**

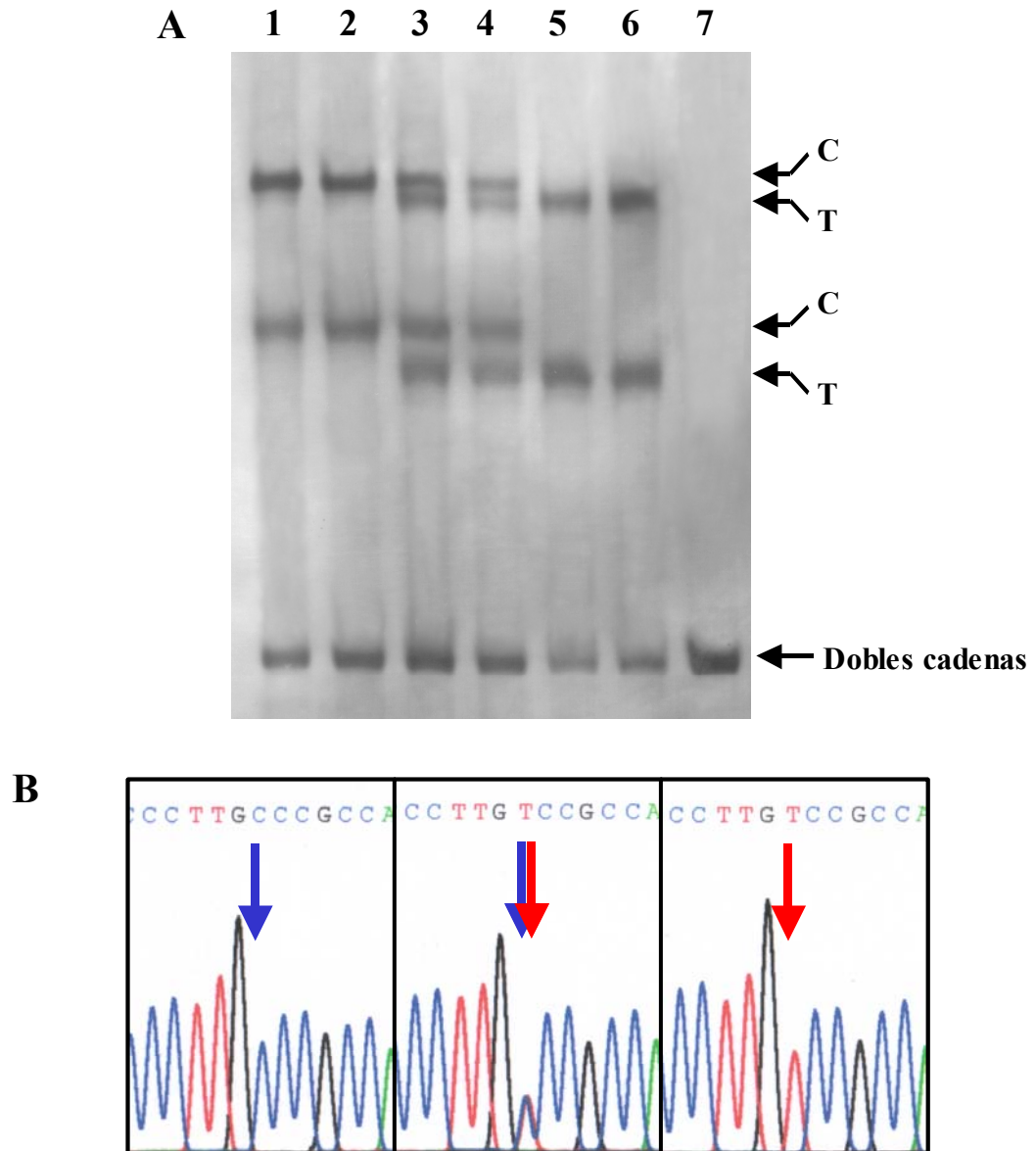
Tras realizar la secuenciación de toda la región codificante del gen de la trombomodulina en los 26 pacientes con historia de TEV y con niveles más bajos de APC, no encontramos ninguna nueva mutación no descrita previamente en la literatura.

### **4.3.2.2 Caracterización de las mutaciones descritas**

A pesar de no haber identificado ninguna mutación nueva en el gen de la trombomodulina, diseñamos la estrategia para realizar el estudio de dos polimorfismos ya descritos en la literatura, cuya asociación con un mayor riesgo trombótico ha sido analizada en diversos estudios, con resultados contradictorios. Estos polimorfismos, el C1418T que produce un cambio de aminoácido de Alanina a Valina en el residuo 455, y el G1456T que produce un cambio de aminoácido de Aspártico a Tirosina en el residuo 468 de la molécula del receptor, están situados en la región de la trombomodulina responsable de la unión a la proteína C, la cual resulta esencial para la generación de APC, por lo que podrían ser responsables de los niveles reducidos de APC observados en los individuos estudiados.

#### **4.3.2.2.1 Análisis de la mutación C1418T (Ala455Val) en el gen de la trombomodulina**

El genotipado del polimorfismo C1418T, que produce un cambio de aminoácido de Alanina a Valina en el residuo 455 situado en el sexto motivo de tipo *EGF* del gen de la trombomodulina, se llevó a cabo mediante el análisis por SSCP de las muestras, puesto que la presencia de la mutación no genera ni modifica ninguna diana de restricción. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida, el cual fue posteriormente teñido con plata para visualizar las bandas resultantes. En la *Figura 4.11* se pueden observar los resultados obtenidos tras la electroforesis de las muestras, así como el cromatograma de secuenciación.

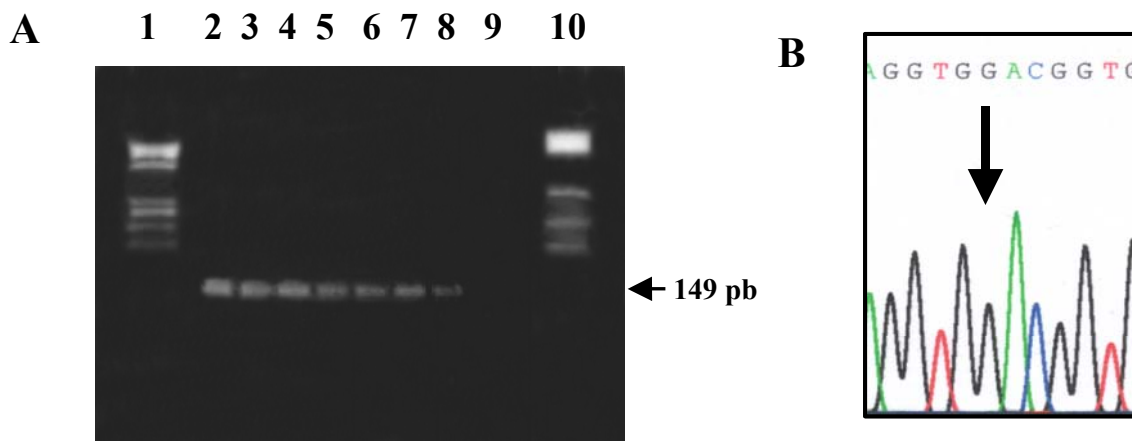


**Figura 4.11. Genotipado del polimorfismo C1418T en el gen de la trombomodulina. A:** Genotipado mediante SSCP. Los pocillos 1 y 2 contienen muestras de genotipo CC. Los pocillos 3 y 4 contienen muestras de genotipo CT. Los pocillos 5 y 6 contienen muestras de genotipo TT. El pocillo 7 contiene como control una muestra amplificada sin desnaturalizar, en la que solamente se observan las dobles cadenas. **B:** Patrón de secuenciación de las muestras. El primer cromatograma corresponde a una muestra de genotipo normal CC, el segundo corresponde a una muestra heterocigota CT y el tercero corresponde a una muestra de genotipo mutado TT.

### 4.3.2.2.2

### Análisis de la mutación G1456T (Asp468Tyr) en el gen de la trombomodulina

El genotipado del polimorfismo G1456T, que produce un cambio de aminoácido de Aspártico a Tirosina en el residuo 468 situado entre el dominio transmembrana y el sexto motivo tipo *EGF* de la trombomodulina, se llevó a cabo mediante el análisis de restricción de las muestras con el enzima *RsaI*, ya que la presencia del alelo mutado T genera una diana de restricción para este enzima. Seguidamente las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos de la digestión. En la *Figura 4.12* se pueden observar los resultados obtenidos tras la digestión de las muestras, así como el cromatograma de secuenciación. No hemos encontrado la mutación en los 145 pacientes con TEV y 162 controles estudiados (415), lo que sugiere que la mutación no es frecuente en nuestra población.



**Figura 4.12. Genotipado del polimorfismo G1456T en el gen de la trombomodulina.** *A:* Genotipado mediante análisis de restricción con el enzima *RsaI*. El pocillo 1 contiene el marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Los pocillos 2 - 8 contienen muestras de genotipo GG, cuyo patrón de bandas es de 149 + 4 pb, esta última inapreciable en el gel. No encontramos ningún paciente ni control portador de la mutación. El pocillo 9 contiene como control negativo una muestra de la mezcla de la digestión sin DNA. El pocillo 10 contiene como control positivo de la reacción, una muestra del plásmido *pGL3-Basic* el cual contiene 9 dianas para este enzima. *B:* Patrón de secuenciación de las muestras. Este cromatograma corresponde a una muestra de genotipo normal GG, el único genotipo encontrado.

### 4.3.2.3 Análisis de la asociación de las mutaciones en el gen de la trombomodulina con el riesgo de trombosis

Una vez dispusimos de estrategias adecuadas para caracterizar las mutaciones, comprobamos el genotipo de los 26 pacientes con TEV y con niveles más bajos de APC estudiados inicialmente mediante secuenciación directa, y ampliamos el estudio a un mayor número de pacientes con TEV y controles. A su vez, en aquellas muestras que fueron secuenciadas se analizó el genotipo de todas las mutaciones previamente descritas en la bibliografía, comprendidas en el fragmento correspondiente.

No encontramos ninguna mutación nueva en la región codificante del gen de la trombomodulina. Existen discrepancias acerca de la asociación del polimorfismo C1418T con el riesgo de trombosis venosa y/o arterial entre los diferentes estudios descritos en la literatura, los cuales apuntan a un efecto neutro del polimorfismo respecto a la trombosis venosa (285, 287, 299) y a un posible incremento del riesgo de trombosis arterial (281, 282, 300). Sin embargo, mediante estudios de expresión se ha observado que ambos alelos son funcionalmente equivalentes (301). En un estudio previo formado por 145 pacientes con historia de TEV y 162 controles sanos, nosotros observamos que el polimorfismo C1418T no es un factor de riesgo para el TEV (415) y, en todo caso, parecía proteger ligeramente del TEV. Por ello decidimos analizar el posible efecto de este polimorfismo en nuestro grupo de pacientes con TEV y controles.

**Tabla 4.5. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo C1418T (Ala455Val) en el gen de la trombomodulina, en pacientes con TEV y controles.**

	PACIENTES TEV	CONTROLES	OR (IC 95%)
<b>FRECUENCIA ALÉLICA</b> n (%)	C 585 (88,4 %)	C 646 (80,6 %)	0,545 (0,41 – 0,73)*
	T 77 (11,6 %)	T 156 (19,4 %)	
<b>FRECUENCIA GENOTÍPICA</b> n (%)	CC 259 (78,3%)	CC 262 (65,3%)	1†
	CT 67 (20,2%)	CT 122 (30,4%)	0,555 (0,39 – 0,78)**
	TT 5 (1,5%)	TT 17 (4,3%)	0,23 (0,11 – 0,82)***

† Grupo de referencia

\* p < 0,0001; \*\* p = 0,0009; \*\*\* p = 0,0156

Paradójicamente, en nuestro estudio el alelo mutado T es más frecuente en los controles que en los pacientes, lo que podría sugerir una disminución del riesgo de TEV en los individuos portadores del alelo 1418T en nuestra población, como indica la fuerte significación estadística. Por ello, analizamos la posible asociación de este polimorfismo con los niveles de APC en los individuos estudiados, observando que estos niveles eran menores en pacientes ( $1,06 \pm 0,46$  ng/ml) que en controles ( $1,26 \pm 0,42$  ng/ml,  $p < 0,0001$ ). El nivel medio de APC en controles aumenta con el número de alelos T presentes, siendo  $1,22 \pm 0,41$  ng/ml para individuos de genotipo CC,  $1,33 \pm 0,41$  ng/ml para individuos de genotipo CT, y  $1,48 \pm 0,46$  ng/ml para de genotipo TT ( $p = 0,004$ ). En un análisis de regresión logística univariante, observamos que la presencia del alelo 1418T y del genotipo 1418TT está asociada con la disminución del riesgo de TEV (OR = 0,52, 0,36 – 0,74 y OR = 0,35, 0,13 – 0,97, respectivamente). Ajustando para sexo, edad, y la presencia de la mayor parte de defectos trombofílicos hereditarios, el riesgo no varió significativamente.

Finalmente, se han descrito otras mutaciones en el gen de la trombomodulina asociadas con trombosis venosa y/o arterial. En diversos estudios, se han identificado mutaciones en la región promotora del gen (281, 409, 416, 417), pero en nuestro estudio no analizamos esta región reguladora. A su vez, se ha descrito la existencia de numerosas mutaciones en la región codificante del gen de la trombomodulina: la mutación G127A (Ala25Thr) posiblemente asociada con un mayor riesgo de infarto de miocardio (284, 286); la mutación G129C (Ala25Ala) (284, 286); la mutación G236C (Gly61Ala) que no modifica las propiedades del receptor (284, 286); la mutación C282G (Pro136Pro) (409); la mutación G543A (Glu163Glu) (284, 286); la delección de los nucleótidos 791 – 801 que da lugar a un codón de parada prematuro en el aminoácido 306 y a la formación de agregados de la proteína no funcional (304); la mutación G1208A (Arg385Lys) (409); la mutación G1209A (Arg385Ser) que parece reducir al 50% la expresión de la proteína (304); la mutación G1456T (Asp468Tyr) que no parece afectar a la expresión y funcionalidad de la proteína (285); la mutación C1483T (Pro477Ser) que da lugar a una reducción del 23% en la expresión de la proteína (284, 286); la mutación C1502T (Pro483Leu) que reduce ligeramente la expresión de una trombomodulina funcional (284, 286); la mutación G1686C (Val544Val) (418); y la inserción insT1689 que da lugar a una proteína con la cola citoplasmática elongada que se acumula cerca del núcleo (418). Al genotipar numerosas muestras de pacientes con TEV y controles mediante secuenciación directa o mediante las estrategias diseñadas, no encontramos ningún paciente ni control que fuera portador de las mismas, lo cual sugiere que son mutaciones de muy baja frecuencia, al menos en nuestra población. (Para mayor información sobre estos estudios realizados de las mutaciones en el gen de la trombomodulina, consultar el apartado 5.3 de la Discusión).

**4.3.3 MUTACIONES EN EL GEN DE LA PROTROMBINA**

**4.3.3.1 Nuevas mutaciones encontradas en el gen de la protrombina**

La *Tabla 4.6* muestra las mutaciones encontradas en el gen de la protrombina y el genotipo obtenido en los 26 pacientes con TEV estudiados para cada una de ellas.



**Tabla 4.6. Mutaciones identificadas en los 26 pacientes con los niveles más bajos de APC, al secuenciar el gen de la protrombina.**

PACIENTES CON TEV	C709T (intrón II)	C1260G (intrón II)	T1462C (intrón III)	G1639A (intrón IV)	C4125G (intrón V)	C4189T (exón 6)	C4203T (exón 6)	C6890T (exón 7)	C7177T (intrón VII)	G8845A (exón 10)	G10253A (exón 12)	A19911G (intrón XIII)	C20068T (exón 14)
APC 113	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GA	AA	CC
APC 114	TT	CC	TT	GG	GG	CC	TT	CC	CC	GG	GG	GG	CC
APC 115	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	AG	CC
APC 117	CC	CC	TC	GG	CG	CC	CC	CC	TT	GA	GG	GG	CC
APC 118	CC	CC	TT	GG	CG	CT	CC	CC	TT	GG	GG	AG	CC
APC 121	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	GG	CC
APC 122	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	AA	CC
APC 123	CC	CC	TC	GG	CG	CC	CC	CC	TT	GA	GG	GG	CC
APC 124	CC	CC	TT	GA	CG	CC	CC	CC	TT	GG	GG	AG	CC
APC 125	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	AG	CC
APC 154	CC	CC	CC	GG	GG	CC	CC	CC	TT	AA	GG	GG	CC
APC 176	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CT	TT	GG	GG	AA	CC
APC 180	CC	CC	TC	GG	CG	CC	CC	CC	TT	GA	GG	GG	CC
APC 195	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	GG	CC
APC 200	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	AA	CC
APC 215	CC	CC	TT	GG	CG	CC	CC	CC	TT	GG	GG	AG	CT
APC 238	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	AG	CC
APC 248	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	AG	CC
APC 250	CC	CC	TT	GA	CG	CC	CC	CC	TT	GG	GG	GG	CC
APC 270	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	AG	CC
APC 275	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	GG	CC
APC 282	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	GG	CC
APC 285	CC	CG	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	AG	CC
APC 335	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	GG	CC
APC 348	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	AG	CC
APC 379	CC	CC	TT	GG	CC	CC	CC	CC	TT	GG	GG	AG	CC

#### **4.3.3.2 Caracterización de las mutaciones encontradas**

Llevamos a cabo la secuenciación directa de un mayor número de muestras para algunos fragmentos del gen, con el fin de analizar si las frecuencias alélicas y/o genotípicas de las mutaciones encontradas eran diferentes entre pacientes y controles, en cuyo caso hubiéramos desarrollado las estrategias adecuadas para realizar un estudio más exhaustivo de dichas mutaciones. Sin embargo, las frecuencias de las mutaciones más ampliamente estudiadas no mostraron diferencias significativas entre los grupos de pacientes y controles por lo que, *a priori*, no las consideramos candidatas para un estudio más amplio, centrándonos en las mutaciones identificadas en los otros tres genes estudiados.

#### **4.3.3.3 Análisis de la asociación de las mutaciones en el gen de la protrombina con el riesgo de trombosis**

Mediante la secuenciación directa de muestras de diferentes fragmentos que contienen las mutaciones de mayor interés encontradas, comprobamos el genotipo de los 26 pacientes con TEV y con los niveles más bajos de APC estudiados inicialmente mediante secuenciación directa, y ampliamos el estudio a un mayor número de pacientes con TEV y controles. A su vez, en aquellas muestras que fueron secuenciadas se analizó el genotipo de todas las mutaciones previamente descritas en la bibliografía, comprendidas en el fragmento correspondiente.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

Tabla 4.7. Frecuencia de las mutaciones identificadas en el gen de la protrombina.

MUTACIÓN	LOCALIZACIÓN EN EL GEN	FRECUENCIAS ALÉLICAS n (%)		
		PACIENTES TEV	CONTROLES	OR (IC 95%)
<b>C709T</b>	intrón II	C 52 (96,3 %)	-	-
		T 2 (3,7 %)	-	
<b>C1260G</b>	intrón II	C 101 (99 %)	C 69 (98,6 %)	0,683 (0,042 – 11,115)
		G 1 (1 %)	G 1 (1,4 %)	
<b>T1462C</b>	intrón III	T 89 (87,3 %)	T 63 (92,6 %)	1,84 (0,624 – 5,425)
		C 13 (12,7 %)	C 5 (7,4 %)	
<b>G1639A</b>	intrón IV	G 92 (92 %)	G 58 (85,3 %)	0,504 (0,188 – 1,352)
		A 8 (8 %)	A 10 (14,7 %)	
<b>C4125G</b>	intrón V	C 42 (77,8 %)	-	-
		G 12 (22,2 %)	-	
<b>C4189T Pro117Pro</b>	exón 6	C 53 (98,1 %)	-	-
		T 1 (1,9 %)	-	
<b>C4203T Thr122Met</b>	exón 6	C 52 (96,3 %)	-	-
		T 2 (3,7 %)	-	
<b>C6890T Gly238Gly</b>	exón 7	C 99 (99 %)	C 88 (100 %)	2,668 (0,107 – 66,397)
		T 1 (1 %)	T 0 (0 %)	
<b>C7177T</b>	intrón VII	C 2 (3,8 %)	-	-
		T 50 (96,2 %)	-	
<b>G8845A Pro368Pro</b>	exón 10	G 83 (90,2 %)	G 75 (89,3 %)	0,904 (0,341 – 2,397)
		A 9 (9,8 %)	A 9 (10,7 %)	
<b>G10253A Pro491Pro</b>	exón 12	G 51 (98,1 %)	-	-
		A 1 (1,9 %)	-	
<b>A19911G</b>	intrón XIII	A 19 (36,5 %)	-	-
		G 33 (63,5 %)	-	
<b>C20068T Arg565Arg</b>	exón 14	C 101 (99 %)	C 100 (100 %)	2,97 (0,12 – 73,846)
		T 1 (1 %)	T 0 (0 %)	
<b>G20210A</b>	exón 14 3' UTR	G 102 (100 %)	G 98 (98 %)	-
		A 0 (0 %)	A 2 (2 %)	

Como se observa en la *Tabla 4.7*, ninguna mutación parece estar asociada con un mayor riesgo de trombosis. Además, la mayor parte de ellas están situadas en regiones intrónicas del gen o en los exones pero sin producir un cambio de aminoácido en la proteína, por lo que no parecen ser candidatas a modificar la expresión y/o

funcionalidad de la proteína. Además, no analizamos la presencia de gran parte de ellas en individuos control, por lo que no es posible evaluar su asociación con el riesgo trombótico. En definitiva, tanto su localización como su frecuencia sugieren que no existe una asociación de las mismas con un mayor riesgo trombótico. La secuencia de la protrombina tomada como referencia presenta un alelo T en posición 1649 (intrón IV). Sin embargo, los 50 pacientes con TEV y los 28 controles estudiados presentaban un alelo C en esta posición, lo que sugiere un error en la secuenciación en la secuencia tomada como referencia. Asimismo, la mutación C7177T situada en el intrón VII parece ser otro error, puesto que la mayor parte de los individuos estudiados son portadores del alelo supuestamente mutado.

Además de estas mutaciones, al secuenciar muestras de 50 pacientes con TEV, 44 controles y 4 pacientes con infarto de miocardio, identificamos 1 paciente con infarto de miocardio portador en heterocigosis de la mutación C6860T (Gly228Gly) situada en el exón 7 del gen. Igualmente, al secuenciar muestras de 46 pacientes con TEV, 42 controles y 31 pacientes con infarto de miocardio, identificamos 1 paciente con infarto de miocardio portador en homocigosis de la mutación G8921C, localizada en el intrón X del gen de la protrombina.

Se ha descrito un total de 39 mutaciones en el gen de la protrombina que dan lugar a deficiencias de protrombina, disprotrombinemia, hipoprotrombinemia, niveles elevados de protrombina en plasma, o trombosis venosa, las cuales están recogidas en la *Human Gene Mutation Database*. Además de las mutaciones anteriormente citadas, no hemos identificado ninguna de las mutaciones recogidas en esta base de datos en nuestros pacientes ni en los controles.

#### **4.3.4 MUTACIONES EN EL GEN DE LA PROTEÍNA C**

##### **4.3.4.1 Nuevas mutaciones encontradas en el gen de la proteína C**

La *Tabla 4.8* muestra las mutaciones encontradas en el gen de la proteína C y el genotipo obtenido en los 26 pacientes con TEV estudiados para cada una de ellas.

El gen que codifica para la proteína C está formado por 9 exones, aunque el exón 1 codifica para la región 5' UT y no para región codificante. Así, la proteína madura está codificada por los exones 2 – 9. Por ello, en muchos trabajos consideran el exón 2 como primer exón del gen. En nuestro caso, hemos mantenido la numeración

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

nucleotídica descrita inicialmente por Foster y col. (381) y la numeración exónica descrita por Plutzky y col. (338).

**Tabla 4.8.** Mutaciones identificadas en los 26 pacientes con los niveles más bajos de APC, al secuenciar el gen de la proteína C.

PACIENTES CON TEV	A-1476T (exón 1)	G1435A (exón 3)	T3342G (exón 6)	T7228C (exón 8)
APC 113	AA	GG	TT	TT
APC 114	TT	GG	TT	CC
APC 115	AT	GG	TG	TT
APC 117	AT	GG	TT	TC
APC 118	AA	GG	TG	TT
APC 121	AA	GG	GG	TT
APC 122	AA	GG	TT	TT
APC 123	AT	GA	GG	TT
APC 124	AT	GG	GG	TT
APC 125	AA	GG	TT	TT
APC 154	AA	GG		TT
APC 176	TT	GG		TT
APC 180	AT	GG	TT	TC
APC 195	AT	GG		TC
APC 200	AA	GG	TT	TT
APC 215	AA	GG		TT
APC 238	AT	GG	TG	TT
APC 248	TT	GG	TG	TC
APC 250	AT	GG	TT	TC
APC 270	AT	GG	TT	TC
APC 275	AA	GG	TG	TT
APC 282	TT	GG		TC
APC 285	TT	GG	TT	CC
APC 335	AA	GG	TT	TT
APC 348	TT	GG	TG	TC
APC 379	AT	GG	TT	TC

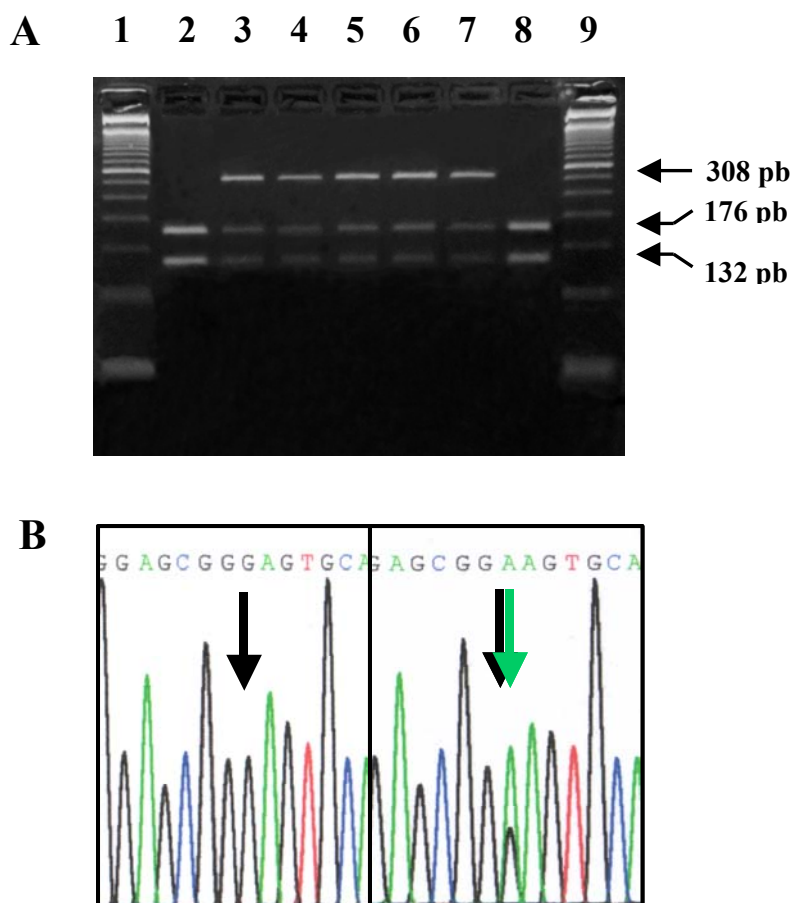
### 4.3.4.2 Caracterización de las mutaciones encontradas

Para llevar a cabo un estudio más amplio de los polimorfismos más relevantes, desarrollamos diferentes estrategias adecuadas para cada uno de ellos.

4.3.4.2.1

Análisis de la mutación G1435A (Glu16Lys) en el gen de la proteína C

El genotipado de la mutación G1435A, que produce un cambio de aminoácido de Glutámico a Lisina en el residuo 16 situado en el dominio Gla de la proteína C, se llevó a cabo mediante el análisis de restricción de las muestras con el enzima *FauI*, ya que la presencia del alelo mutado A elimina una diana de restricción para este enzima. Seguidamente las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos de la digestión. En la *Figura 4.13* se pueden observar los resultados obtenidos tras la digestión de las muestras, así como el cromatograma de secuenciación. En presencia del alelo común (alelo G) el fragmento original de 308 pb se escinde en dos fragmentos de 176 y 132 pb, mientras que en presencia de la mutación (alelo A), éste permanece íntegro.



**Figura 4.13. Genotipado de la mutación G1435A en el gen de la proteína C.** *A:* Genotipado mediante análisis de restricción con el enzima *FauI*. Los pocillos 1 y 9 contienen el marcador de peso molecular de 50 pares de bases. Los pocillos 2 y 8 contienen muestras de genotipo GG, cuyo patrón de bandas es de 176 + 132 pb. Los pocillos 3 - 7 contienen muestras de genotipo GA, cuyo patrón de bandas es de 308 + 176 + 132 pb. No encontramos ningún paciente ni control con genotipo AA. *B:* Patrón de secuenciación de las muestras. El primer cromatograma corresponde a una muestra de genotipo normal GG, y el segundo corresponde a una muestra heterocigota GA.

**4.3.4.3 Análisis de la asociación de las mutaciones en el gen de la proteína C con el riesgo de trombosis**

Una vez dispusimos de estrategias adecuadas para caracterizar las mutaciones encontradas, comprobamos el genotipo de los 26 pacientes con TEV y con niveles más bajos de APC estudiados inicialmente mediante secuenciación directa, y ampliamos el estudio a un mayor número de pacientes con TEV y controles. A su vez, en aquellas muestras que fueron secuenciadas se analizó el genotipo de todas las mutaciones previamente descritas en la bibliografía, comprendidas en el fragmento correspondiente.

*Tabla 4.9. Frecuencia de las mutaciones identificadas en el gen de la proteína C.*

MUTACIÓN	LOCALIZACIÓN EN EL GEN	FRECUENCIAS ALÉLICAS n (%)	
		PACIENTES TEV	
A-1476T	exón 1 5' UTR	A	30 (57,7 %)
		T	22 (42,3 %)
G1435A Glu16Lys	exón 3	Privativa de una familia	
T3342G Ser99Ser	exón 6	T	32 (72,7 %)
		G	12 (27,3 %)
T7228C Asp214Asp	exón 8	T	39 (75 %)
		C	13 (25 %)

La naturaleza de las mutaciones A-1476T, T3342G y T7228C identificadas en el gen de la proteína C, sugiere que éstas no afectan de forma directa a la funcionalidad de la proteína, puesto que la mutación A-1476T está situada en la región 5' UT y las mutaciones T3342G y T7228C, localizadas en regiones exónicas, no dan lugar a un cambio de aminoácido en la proteína. Además, los niveles de proteína C antigénica eran normales en los individuos portadores de estas mutaciones, descartando que las mutaciones den lugar a un cambio en la expresión del gen.

La mutación G1435A, localizada en el exón 3 del gen, da lugar a un cambio de aminoácido de Glutámico a Lisina en el residuo 16 de la proteína. Éste es uno de los 9 residuos que serán modificados post-traduccionalmente a residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (Gla), puesto que conforman el dominio Gla de la proteína esencial para la unión de la proteína a superficies cargadas negativamente y para su función anticoagulante. Esta mutación se identificó en un paciente con TEV y con niveles de

APC extremadamente bajos. Sin embargo, al ser privativa de una familia, no podemos calcular su asociación con el riesgo trombótico. Actualmente estamos realizando estudios para su caracterización.

Se ha descrito un total de 232 mutaciones en el gen de la proteína C, que dan lugar a deficiencias de proteína C o a una reducción de los niveles plasmáticos de proteína C, las cuales están recogidas en la *Human Gene Mutation Database*. Además de las mutaciones anteriormente citadas, no hemos identificado ninguna de las mutaciones recogidas en esta base de datos en nuestros pacientes ni en los controles.

#### **4.4 ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL EPCR A LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE EPCR SOLUBLE Y DE APC CIRCULANTE, Y AL RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA**

El EPCR es una proteína esencial en el proceso de activación de la proteína C, puesto que potencia la tasa de generación de la APC por el complejo formado por la trombina y la trombomodulina (54), principalmente sobre la superficie de la célula endotelial de los grandes vasos. Existe una forma de EPCR soluble en plasma, el sEPCR, el cual se genera *in vitro* mediante la degradación proteolítica por una metaloproteasa inducida por trombina y otros mediadores de la inflamación, en un proceso llamado *shedding* (52). No se conoce la función fisiológica del sEPCR *in vivo*, pero éste mantiene la capacidad de unirse tanto a la proteína C como a la APC con la misma afinidad que la forma del receptor anclado a la membrana, aunque no presenta la capacidad de potenciar la activación de la proteína C (419), sino que impide la activación de estas moléculas sobre el endotelio. A su vez, inhibe la actividad anticoagulante de la APC mediante la formación de un complejo incapaz de unirse a la membrana fosfolipídica (55). Se ha descrito que aquellos pacientes con lupus eritematoso sistémico y sepsis presentan niveles de sEPCR más elevados que los individuos sanos (53). En individuos sanos, los niveles de sEPCR muestran una distribución bimodal, de manera que la mayoría de éstos presentan niveles de sEPCR plasmáticos entre 75 y 175 ng/ml, mientras que aproximadamente un 20% de individuos sanos presentan niveles mucho más elevados, hasta 700 ng/ml (420). Los niveles plasmáticos de sEPCR responden al tratamiento con anticoagulantes orales, lo cual sugiere que podrían ser un marcador de estados de hipercoagulabilidad (420).

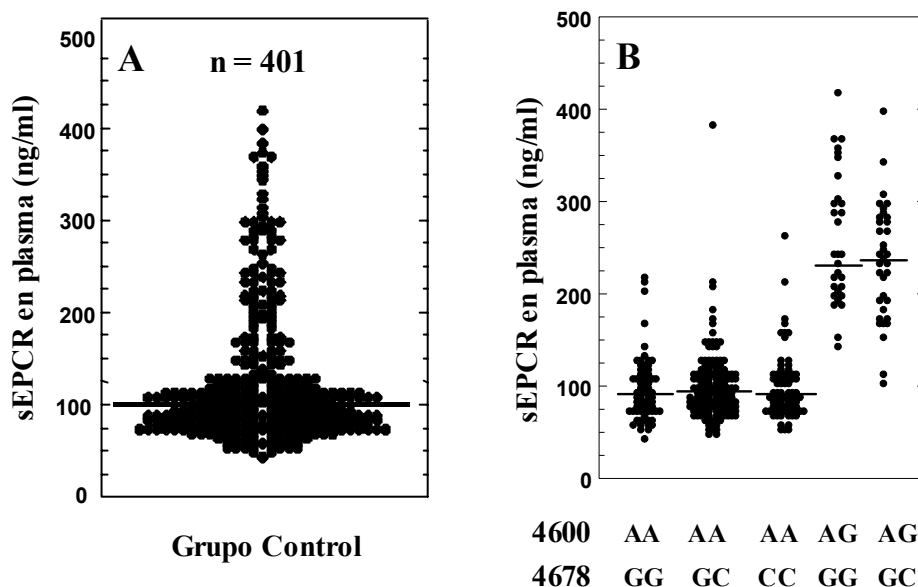
La masa molecular del sEPCR es aproximadamente 4000 Daltons menor que la de la forma anclada a la membrana (52), lo cual indica que la ruptura proteolítica debe



ocurrir dentro de la región del EPCR codificada por el exón 4 del gen. Por tanto, la presencia de posibles mutaciones funcionales en esta región del gen podría explicar la distribución bimodal de los niveles plasmáticos de sEPCR, a causa de una mayor expresión de EPCR o a la expresión de una forma de EPCR más susceptible al corte por las metaloproteasas.

Como se indica anteriormente, hemos identificado dos polimorfismos en el exón 4 del gen del EPCR, el polimorfismo A4600G que predice un cambio de Serina a Glicina en el aminoácido 219 situado en la región transmembrana del gen, y el polimorfismo G4678C en la región 3' no traducida del gen (421). Por ello, quisimos analizar el posible efecto de la presencia de estos cambios sobre los niveles de sEPCR y de APC circulante, y su efecto sobre el riesgo de TEV. Para ello seleccionamos un grupo de pacientes con TEV y un grupo control de individuos sanos a los que medimos los niveles de sEPCR y APC circulante y cuyo genotipo para estos dos polimorfismos determinamos siguiendo los métodos descritos anteriormente.

La *Figura 4.14* muestra la distribución de los niveles plasmáticos de sEPCR en 401 individuos sanos. Nuestros resultados confirman la distribución bimodal de los niveles de sEPCR descrita previamente en la población general.



**Figura 4.14.** Distribución de los niveles plasmáticos de sEPCR, los cuales son dependientes del polimorfismo A4600G. *A:* Niveles plasmáticos de sEPCR en el grupo de individuos sanos. *B:* Niveles de sEPCR en los mismos individuos agrupados en función de la combinación de sus genotipos para los polimorfismos A4600G y G4678C en el exón 4 del gen del EPCR. Las barras indican el valor medio para cada grupo.

El valor medio de sEPCR en el grupo de 401 individuos sanos fue 102 ng/ml (rango: 45 – 416). El 82% de individuos mostraron niveles de sEPCR por debajo de 175 ng/ml, mientras que el 18% mostraron niveles de sEPCR por encima de 175 ng/ml. Tal y como fue descrito anteriormente, el nivel medio de sEPCR en hombres (108 ng/ml; rango: 45-416) fue mayor que en mujeres (95 ng/ml; rango: 50-398) ( $p = 0,012$ ).

El nivel medio de APC en los 401 individuos sanos fue 1,22 ng/ml (rango: 0,41-3,24). No se encontró una diferencia significativa entre los niveles de APC de hombres y mujeres.

Seguidamente, analizamos el efecto de la presencia de los polimorfismos A4600G y G4678C sobre los niveles de sEPCR y/o sobre los niveles de APC. La frecuencia del alelo 4600G en los individuos sanos fue de 0,092. De éstos, 327 individuos eran portadores del genotipo 4600AA y 74 eran portadores del genotipo 4600AG. No encontramos ningún individuo sano portador del genotipo 4600GG. El nivel medio de sEPCR fue significativamente mayor en los portadores del genotipo AG (242 ng/ml; rango: 77 – 416) que en los portadores del genotipo AA (93 ng/ml; rango: 45 – 383) ( $p < 0,0001$ ). El 88% de los individuos con genotipo AG y sólo el 3% de los portadores del genotipo AA mostraron niveles de sEPCR  $\geq 175$  ng/ml ( $p < 0,0001$ ). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de APC entre individuos portadores del genotipo 4600AA (1,21 ng/ml; rango: 0,41 – 3,24) y los portadores del genotipo 4600AG (1,27 ng/ml; rango: 0,54 – 2,28) ( $p = 0,260$ ).

La frecuencia del alelo 4678C fue de 0,470. 113 individuos eran portadores del genotipo 4678GG, 199 del genotipo GC y 89 eran portadores del genotipo CC. Los niveles de APC circulante aumentaron con el número de alelos 4678C presentes ( $p = 0,006$ ).

Con el fin de analizar más profundamente la influencia de estos polimorfismos sobre los niveles de sEPCR y de APC, agrupamos los individuos en función de la combinación de los genotipos para ambos cambios. La *Tabla 4.10* y la *Figura 4.14B* muestran los resultados obtenidos. Muy recientemente, Saposnik y col. (411) han descrito la presencia de 13 polimorfismos en el gen del EPCR que en conjunto definen tres haplotipos, denominados A1, A2 y A3. Parece ser que los alelos 4678C y 4600G son exclusivos de los haplotipos A1 y A3, respectivamente, con lo que se convierten en SNPs marcadores de estos haplotipos. Para facilitar la comparación de los datos obtenidos por Saposnik con los nuestros, hemos incluido los haplotipos correspondientes en la *Tabla 4.10*.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

**Tabla 4.10.** Niveles de sEPCR y APC (media y rango) y de los fragmentos F1+2 de la protrombina (media  $\pm$  DE) en controles, de acuerdo con los polimorfismos A4600G y G4678C en el gen del EPCR.

GENOTIPO	n	sEPCR (ng/ml)	APC (ng/ml)	F1+2 (nM)
(1) AA/GG (A2A2) <sup>†</sup>	78	92 (45 – 315)	1,10 (0,50 – 2,25)	0,78 $\pm$ 0,24
(2) AA/GC (A1A2)	160	94 (50 – 383)	1,20 (0,41 – 2,30)	0,82 $\pm$ 0,24
(3) AA/CC (A1A1)	89	90 (52 – 264)	1,36 (0,50 – 3,24)	0,89 $\pm$ 0,30
(4) AG/GG (A2A3)	35	235 (101 – 416)	1,27 (0,54 – 2,25)	1,00 $\pm$ 0,32
(5) AG/GC (A1A3)	39	243 (77 – 398)	1,31 (0,72 – 2,28)	0,89 $\pm$ 0,31
(6) GG/GG (A3A3)	0	--	--	--

<sup>†</sup> Para comparar los resultados con los descritos por Saposnik B y col (411), las combinaciones de genotipos han sido convertidas en las combinaciones de haplotipos.

Las diferencias significativas entre grupos (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001):

Según el ensayo de Kruskal-Wallis: (1) – (2) – (3): APC\*\*; F1+2\*\*.

Entre parejas de grupos: sEPCR: 1 vs 4 o 5\*\*\*; 2 vs 4 o 5\*\*\*; 3 vs 4 o 5\*\*\*; APC: 1 vs 2 (p = 0,078); 1 vs 3\*\*; 2 vs 3\*\*; 1 vs 4 (p = 0,110); 2 vs 5 (p = 0,166); 4 vs 5 (p = 0,305); F1+2: 1 vs 2 (p = 0,066); 1 vs 3\*\*; 2 vs 3\*; 1 vs 4\*\*\*; 2 vs 5 (p = 0,067); 4 vs 5 (p = 0,158).

Es evidente que el alelo 4600G (haplotipo A3) está fuertemente asociado con unos niveles elevados de sEPCR, mientras que el alelo 4678C (haplotipo A1) está asociado, en menor extensión, con niveles elevados de APC. La ausencia de individuos con la combinación 4600AG/4678CC confirma que los alelos 4600G y 4678C identifican dos haplotipos diferentes del gen del EPCR.

El polimorfismo A4600G explicó el 56% de la varianza total de los niveles de sEPCR (p < 0,0001) y fue el único y más importante factor determinante de los niveles de sEPCR en nuestra población sana. Otros factores determinaron un 4,7% de la variación, incluyendo los niveles de F1+2 que determinaron el 1,7% (p = 0,0003), los niveles de proteína C que determinaron el 1,6% (p = 0,0007) y el sexo que determinó el 1,4% (p = 0,0007). En el análisis multivariante, otro tipo de variables como el polimorfismo G4678C, el nivel de APC y la edad, no mostraron estar significativamente asociadas con los niveles de sEPCR (p > 0,28).

El polimorfismo G4678C explicó el 2,1% de la varianza total de los niveles de APC (p = 0,005). Otras variables determinaron otro 11,9%, incluyendo los niveles de

proteína C que determinaron un 9,4% ( $p < 0,0001$ ) y los niveles de F1+2 que determinaron el 2,5% de la varianza ( $p = 0,002$ ). Otros factores como el polimorfismo A4600G ( $p = 0,894$ ), el sexo ( $p = 0,072$ ), los niveles de sEPCR ( $p = 0,912$ ) y la edad ( $p = 0,676$ ), no mostraron estar significativamente asociados con los niveles de APC.

Puesto que la liberación *in vivo* de EPCR, en ratas, depende de la generación de trombina (155), medimos los niveles de F1+2 en los 401 individuos sanos. El nivel medio de F1+2 fue  $0,85 \pm 0,28$  nM. El nivel medio de F1+2 fue significativamente mayor en individuos con niveles de sEPCR  $\geq 175$  ng/ml que en aquellos con niveles de sEPCR  $< 175$  ng/ml ( $p = 0,0003$ ), y en individuos con genotipo 4600AG que en aquellos con genotipo AA ( $p = 0,002$ ). Es más, como se puede observar en la *Tabla 4.10*, en aquellos individuos portadores del genotipo 4600AA, los niveles de F1+2 incrementaron con el número de alelos 4678C presentes ( $p = 0,003$ ), de forma paralela al incremento de los niveles de APC ( $p = 0,002$ ).

Asimismo, estudiamos las correlaciones entre los niveles de sEPCR, APC circulante, F1+2 y la edad en los 401 individuos sanos. Se pudo observar una correlación débil pero significativa entre los niveles de sEPCR y F1+2 ( $r = 0,173$ ;  $p = 0,001$ ), los niveles de sEPCR y la edad ( $r = 0,112$ ;  $p = 0,025$ ), y entre los niveles de APC y F1+2 ( $r = 0,160$ ;  $p = 0,021$ ).

Con el fin de evaluar la influencia de estos dos polimorfismos sobre el riesgo de trombosis, genotipamos 405 pacientes con historia de tromboembolismo venoso. La frecuencia del alelo 4600G (haplotipo A3) fue muy similar en pacientes y controles (0,094 vs 0,092, respectivamente;  $p = 0,975$ ). De los 405 pacientes, 331 eran portadores del genotipo 4600AA, 72 eran portadores del genotipo AG y dos pacientes eran portadores del genotipo GG. Respecto al polimorfismo G4678C, la frecuencia del alelo 4678C (haplotipo A1) fue de 0,409 en pacientes y de 0,470 en controles ( $p = 0,016$ ). De los 405 pacientes, 132 eran portadores del genotipo 4678GG, 215 eran portadores del genotipo GC y 58 eran portadores del genotipo CC. En un análisis univariante (*Tabla 4.11*), la presencia del alelo 4600G (haplotipo A3) no incrementó el riesgo de TEV (OR 0,97, IC 95% 0,70 – 1,37) mientras que los portadores del genotipo 4678CC (homocigoto A1A1) mostraron una reducción en el riesgo de TEV (OR, 0,59; IC 95% 0,41 – 0,84). Ajustando para el sexo, la edad, y la presencia de la mutación factor V Leiden y del polimorfismo G20210A de la protrombina en un análisis multivariante, los ORs no variaron significativamente (0,90; IC 95% 0,65 – 1,52 y 0,61; IC95% 0,39 – 0,90, respectivamente). No se encontraron diferencias significativas en los ORs entre hombres y mujeres.

*Tabla 4.11. Distribución de haplotipos y genotipos en pacientes y controles.*

	PACIENTES (n = 405)	CONTROLES (n = 401)	OR (IC 95%; p)
<b>FRECUENCIA ALÉLICA (HAPLOTIPO):</b>			
4678C (A1)	0,409	0,470	0,78 (0,64 – 0,96; 0,014)* 0,78 (0,63 – 0,97; 0,016)†
4600G (A3)	0,094	0,092	0,97 (0,70 – 1,37; 0,932)* 0,90 (0,65- 1,52; 0,562)†
<b>FRECUENCIA GENOTÍPICA:</b>			
4678CC (A1A1)	0,143	0,222	0,59 (0,41 – 0,84; 0,005)* 0,61 (0,39 – 0,90; 0,009)†
4600AG (A3Ax)	0,178	0,184	0,97 (0,68 – 1,40; 0,888)* 0,90 (0,66 – 1,54; 0,562)†

\* Análisis univariante.

† Análisis multivariante ajustado para sexo, edad, presencia de la mutación factor V Leiden y del polimorfismo G20210A de la protrombina.

#### **4.5 ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL EPCR AL RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA EN INDIVIDUOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN FACTOR V LEIDEN**

La resistencia hereditaria a la proteína C activada (422) es el factor de riesgo genético más común para la trombosis venosa familiar (11, 114, 423). Esta patología es debida a una mutación puntual en el gen que codifica para el factor V de la coagulación, un factor esencial para la generación de trombina. Esta mutación consiste en una transición de G a A en el nucleótido situado en posición 1691 del gen de factor V, comúnmente denominada mutación factor V Leiden (114). Esta mutación está presente en el 1 – 5% de la población caucásica y en el 20 – 50% de los pacientes con TEV hereditario (11, 31, 260, 261). Su expresión clínica muestra una amplia variación intra-

e inter-familiar, lo cual puede ser explicado por la presencia concomitante de la mutación factor V Leiden con otros factores de riesgo (424). De hecho, el tromboembolismo venoso es una enfermedad multifactorial, puesto que tanto los factores genéticos como los factores ambientales juegan un papel en la patogenia de la enfermedad. Las interacciones entre la mutación factor V Leiden y los anticonceptivos orales (268), el polimorfismo G20210A en el gen de la protrombina (425), o las deficiencias de proteína C (253) y proteína S (426) incrementan el riesgo de TEV. Por el contrario, la presencia de polimorfismos en las rutas anticoagulantes podría resultar en una ganancia de función y, por tanto, dar lugar a una reducción del riesgo de TEV. Hemos identificado dos polimorfismos localizados en el exón 4 del gen del EPCR, la mutación A4600G que produce un cambio de Serina a Glicina en el aminoácido 219 localizado en la región transmembrana del gen, y el polimorfismo G4678C localizado en la región 3' no traducida del gen (421). Mientras que el polimorfismo G4678C está asociado a niveles elevados de APC y a la disminución del riesgo de TEV, el polimorfismo A4600G está asociado a niveles elevados de sEPCR pero no parece ejercer ningún efecto sobre los niveles de APC. Saposnik y col. (411) han descrito que el alelo 4600G está representado en mayor proporción en pacientes con TEV, dando lugar a un OR de 1,8 ( $p = 0,004$ ). Nosotros hemos observado que este polimorfismo no está asociado con el riesgo de TEV (427). Por ello, como hipótesis planteamos si en los individuos portadores de la mutación factor V Leiden la presencia del alelo 4678C del gen del EPCR pudiese ejercer un papel antitrombótico compensatorio reduciendo el riesgo de TEV. Por el contrario, y de acuerdo con los resultados descritos por Saposnik (411), la presencia del alelo 4600G podría incrementar este riesgo. Por tanto, investigamos si la presencia de estos dos polimorfismos en el gen del EPCR modifica el riesgo de TEV ya incrementado que presentan los portadores de la mutación factor V Leiden.

Para ello, realizamos el genotipado de ambos polimorfismos en un conjunto de 218 individuos portadores de la mutación factor V Leiden, de los cuales 76 eran pacientes con historia de TEV y los 142 individuos restantes que constituyeron el grupo control eran familiares de los pacientes, también portadores de la mutación factor V Leiden pero asintomáticos.

La frecuencia del alelo 4600G en el gen del EPCR fue similar en portadores de la mutación factor V Leiden sintomáticos (9,9%) que en los portadores asintomáticos (12%) ( $p = 0,633$ ), al igual que la frecuencia del genotipo 4600AG (17,1% y 21,1%, respectivamente) ( $p = 0,594$ ). Un paciente y dos controles eran portadores del genotipo 4600GG.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

Respecto a la mutación G4678C, la frecuencia del alelo 4678C fue menor en portadores del factor V Leiden sintomáticos (36,2%) que en asintomáticos (47,2%) ( $p = 0,033$ ). Del total de individuos, 31 pacientes (40,8%) y 43 controles (30,3%) eran portadores del genotipo 4678GG, 35 pacientes (46,1%) y 64 controles (45,1%) eran portadores del genotipo GC, y 10 pacientes (13,2%) y 35 controles (24,6%) eran portadores del genotipo CC.

Con el fin de identificar posibles asociaciones entre los diferentes genotipos y el TEV, realizamos un análisis de regresión logística, cuyos resultados pueden observarse en la *Tabla 4.12*.

**Tabla 4.12. Influencia de los polimorfismos A4600G y G4678C en el gen del EPCR sobre el riesgo de tromboembolismo venoso en portadores de la mutación factor V Leiden (FVL).**

POLIMORFISMO	PORTADORES FVL SINTOMÁTICOS (n = 76)		PORTADORES FVL ASINTOMÁTICOS (n = 142)		OR (IC 95%)
	n	FRECUENCIA	n	FRECUENCIA	
	<b>A4600G</b>				
ALELO G	15	0,099	34	0,120	0,78 (0,38 – 1,56)* 0,68 (0,29 – 1,39)†
GENOTIPO AG	13	0,171	30	0,211	0,77 (0,37 – 1,58)* 0,63 (0,31 – 1,30)†
<b>G4678C</b>					
ALELO C	55	0,362	134	0,472	0,63 (0,35 – 0,99)* 0,58 (0,33 – 0,96)†
GENOTIPO CC	10	0,132	35	0,246	0,46 (0,21 – 0,99)* 0,41 (0,19 – 0,93)†

\* Análisis univariante.

† Análisis multivariante ajustado para sexo, edad, presencia del polimorfismo G20210A de la protrombina y de los polimorfismos A4600G y G4678C del EPCR.

En un análisis univariante, la presencia del alelo 4600G (OR 0,78, IC 95% 0,38–1,56) o la presencia del genotipo AG (OR 0,77, IC 95% 0,37 – 1,58) no modificó significativamente el riesgo de TEV en individuos portadores de la mutación factor V Leiden, mientras que los individuos portadores del alelo 4678C (OR 0,63, IC 95% 0,35–0,99) o del genotipo CC (OR 0,46, IC 95% 0,21-0,99) mostraron una reducción del riesgo de trombosis al ser comparados con los individuos portadores del alelo 4678G o con los portadores de los genotipos 4678GC o 4678GG, respectivamente. En un análisis multivariante, tras ajustar para sexo, edad, el polimorfismo G20210A de la protrombina y la presencia del otro polimorfismo del EPCR, los ORs no resultaron modificados significativamente.





## **5. DISCUSIÓN**



## **5.1 ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE APC CIRCULANTE**

Además de su función como mecanismo anticoagulante, la ruta anticoagulante de la proteína C ejerce un importante papel en diferentes patologías (122, 125-127, 215, 428-430). Se ha observado la activación de la proteína C en pacientes con infarto de miocardio durante la terapia trombolítica con activador tisular del plasminógeno (368) y con estreptokinasa (431). A su vez, la activación de la proteína C resulta favorecida en individuos con situaciones clínicas asociadas a una mayor tendencia a sufrir episodios trombóticos, tales como gestación, preeclampsia, tumores ginecológicos, diabetes, hemodiálisis, o toma de anticonceptivos orales (119). Se ha utilizado la APC y/o proteína C en el tratamiento de pacientes con coagulación intravascular diseminada así como en niños con deficiencia severa de proteína C y purpura fulminans (98-108, 209, 257). El defecto congénito de resistencia a la proteína C activada (264), es el defecto genético más común causante de la trombosis venosa y de la trombofilia (11, 31, 99, 252-256, 432-434). Asimismo, datos clínicos y experimentales sugieren que una deficiencia en la producción de APC podría dar lugar a un estado pretrombótico. Esta deficiencia de APC puede ser debida a una incorrecta activación de la proteína C, a un defecto en la molécula del zimógeno proteína C, o a una inhibición excesiva de la APC. Todos estos datos refuerzan la importancia de la determinación de los niveles de APC circulante como marcador de estados patológicos. Por tanto, resulta crucial disponer de un ensayo rápido, sensible y sencillo para la cuantificación de los niveles de APC circulante, como modo más directo de analizar la generación de APC.

Nosotros hemos puesto a punto un ensayo para la medida de los niveles de APC circulante. El ensayo combina un bajo límite de detección (0,1 ng/ml) y un corto tiempo de desarrollo (4 – 5 h). Nuestro ensayo es original y está basado en la capacidad de la APC circulante para, en presencia de heparina, formar complejos preferentemente con su principal inhibidor plasmático, el PCI (359). El ensayo es favorable en comparación con otros dos ensayos descritos anteriormente. Así, el ensayo descrito por Gruber y Griffin (435) consiste en la captura del enzima mediante un anticuerpo monoclonal (C3) (el mismo usado por nosotros) inmovilizado en una placa de ELISA, seguido de la medida de la actividad amidolítica de la APC unida a la placa mediante un sustrato cromogénico. La sangre se extrae en presencia de benzamidina, un inhibidor reversible de la APC, para prevenir su inactivación por los inhibidores plasmáticos de la APC (PCI y  $\alpha_1$ AT). Sin embargo, el límite de detección de este ensayo es de 0,3 – 0,5 ng/ml, lo cual no lo hace adecuado para cuantificar los niveles reducidos observados en controles y en mayor porcentaje en pacientes con trombosis, en los que los niveles de APC

pueden bajar hasta 0,1 ng/ml. Además, para la cuantificación de niveles de APC entre 0,3 y 0,8 ng/ml se requiere un tiempo de desarrollo de entre 3 y 4 semanas, todo lo cual dificulta su uso. El método descrito por Orthner y col. (436) es una pequeña variante del anterior, pero su alto límite de detección (5 ng/ml) excluye definitivamente su utilidad tanto para la medida de APC en sujetos sanos (donde el rango de niveles de APC es de 0,5 a 4 ng/ml) (435, 437), como sobre todo en aquellas patologías donde se espera observar una reducción de los niveles de APC circulante. El uso de estos dos métodos, por tanto, parece limitado a la cuantificación de la APC circulante en aquellos casos en los que se administra APC recombinante, como ocurre en pacientes con sepsis o en cuadros de coagulación intravascular diseminada, donde los niveles de APC pueden llegar hasta 20 ng/ml.

Para comparar la precisión de la determinación de APC con nuestro ensayo frente al método de Gruber y Griffin, además de los dos tubos necesarios para la determinación de APC con nuestro método, se extrajo un tercer tubo de sangre anticoagulada con citrato a 10 individuos sanos, al cual se añadió inmediatamente benzamidina hasta alcanzar una concentración final de 300 mM, y seguidamente determinamos los niveles de APC por ambos métodos. Observamos una correlación significativa entre los resultados obtenidos por ambos métodos. Sin embargo, el valor absoluto de APC en cada muestra determinado mediante nuestro ensayo fue inferior al valor obtenido mediante la técnica de Gruber y Griffin. Posiblemente este hecho sea debido a que, para la calibración de cada ensayo, se utiliza un estándar diferente: en el ensayo de Gruber y Griffin se utiliza APC purificada, mientras que en nuestro ensayo utilizamos complejos APC:PCI purificados.

A diferencia de los métodos descritos anteriormente (435, 436), nuestro ensayo no mide la actividad amidolítica de la APC, sino que mide los complejos formados entre la APC circulante en el plasma y su principal inhibidor, el PCI. Tanto niveles reducidos de PCI como niveles elevados de  $\alpha_1$ AT en plasma, podrían disminuir la formación de estos complejos y, por tanto, modificar el resultado final del ensayo de APC. La recuperación de la APC únicamente resultó afectada cuando la concentración de PCI en plasma disminuyó por debajo de 0,5  $\mu$ g/ml (10% del valor presente en plasma humano normal), o cuando la concentración de  $\alpha_1$ AT en plasma se incrementó por encima del 200% del valor en plasma humano normal.

Puesto que el anticuerpo de captura utilizado en el ensayo de la APC es un anticuerpo monoclonal anti-proteína C (C3), analizamos si posibles variaciones en los niveles plasmáticos de proteína C podrían modificar la tasa de unión de los complejos APC:PCI al anticuerpo adsorbido a la placa. Observamos que concentraciones de

proteína C en plasma entre un 25% y un 200% del nivel normal de proteína C no afectaron de forma significativa a la recuperación de APC en el ensayo.

El PCI inhibe con la misma eficiencia a la APC y a la descarboxi-APC (360), la cual se encuentra en pacientes en tratamiento con anticoagulantes orales. Por tanto, nuestro ensayo codeterminará ambas formas de la APC aunque la APC carente de dominio Gla presente una baja o nula actividad *in vivo*. Asimismo, las potenciales moléculas de APC con una función biológica anormal pero una reactividad normal hacia el PCI no serán discriminadas mediante este ensayo. Sin embargo, en ambos casos la determinación de la proteína C funcional en las muestras mediante un ensayo coagulométrico aportará información sobre la posible anormalidad de la molécula de APC.

Hemos observado que los niveles de APC circulante son proporcionales a los niveles totales de proteína C (365, 408), y que los individuos con bajos niveles de proteína C presentan niveles reducidos de APC. Dichas observaciones sugieren que la concentración de proteína C circulante sería el factor limitante en la tasa de activación de la proteína C. Sin embargo, existen otras situaciones clínicas potenciales en las que el mecanismo de activación de la proteína C podría estar reducido a pesar de la existencia de unos niveles normales de proteína C, como anormalidades en el complejo trombina-trombomodulina o una expresión reducida de trombomodulina o de EPCR, cuya existencia podría ser detectada mediante la determinación de los niveles de APC.

Paralelamente, puesto que la APC es un potente anticoagulante, consideramos que resultaría de especial interés comprobar si bajas concentraciones de APC en plasma están asociadas con un incremento en la incidencia de episodios tromboembólicos.

## **5.2 ESTUDIO DE NIVELES REDUCIDOS DE APC CIRCULANTE COMO FACTOR DE RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA**

En este estudio, evaluamos la asociación entre una reducción de los niveles de APC y el riesgo de TEV. Para ello, medimos los niveles de APC circulante en 160 pacientes con historia de TEV y en 199 voluntarios sanos. Nuestros resultados indican que una concentración de APC reducida constituye un importante factor de riesgo prevalente e independiente para el TEV. En el 24% de los pacientes con TEV se observaron niveles de APC muy reducidos, por debajo de 0,69 ng/ml (correspondiente al percentil 5% del grupo control) (OR 4,7) (ver *Tabla 4.1* en Resultados). Esto significa que los individuos con niveles de APC circulante por debajo de 0,69 ng/ml tienen unas

5 veces más riesgo de padecer un episodio de TEV que aquellos que tienen niveles de APC por encima de dicho valor.

La reducción en los niveles de APC puede ser debida a varios mecanismos fisiopatológicos. El mecanismo anticoagulante de la proteína C juega un papel importante en el mantenimiento de la hemostasia. La proteína C es un zimógeno que debe ser activado para poder ejercer sus funciones anticoagulantes. Esta activación tiene lugar en la superficie de la célula endotelial, donde se forma un complejo entre la trombina, la proteína C y sus respectivos receptores, la trombomodulina y el EPCR. De esta manera, la trombina se convierte en un potente activador de la proteína C promoviendo la generación de APC. Por tanto, una reducción en la generación de trombina podría repercutir en una disminución de los niveles de APC. Sin embargo, los niveles de APC reducidos observados en algunos pacientes con TEV no eran el resultado de un descenso en la generación de trombina, puesto que los pacientes con bajos niveles de APC mostraron niveles de F1+2 similares a los individuos del grupo control, indicando una tasa normal de generación de trombina. Por tanto, los niveles de APC reducidos observados en algunos pacientes con TEV deberían ser explicados por mecanismos alternativos. Dos mecanismos pueden ser propuestos. Por un lado, defectos moleculares en las proteínas implicadas en la generación de APC puede dar lugar a una deficiente interacción entre ellas y a una reducción de la generación de APC. Por otro lado, una modificación temporal de la expresión génica también podría dar lugar a una alteración en dicha generación de APC.

En el primer caso, la presencia de mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas podría explicar esta reducción en los niveles de APC observada en pacientes con TEV. De hecho, se ha descrito la asociación entre mutaciones en el gen de la trombomodulina (284, 286, 287, 409, 416, 438, 439) o en el del EPCR (410, 413) y la trombosis venosa. Asimismo, el estudio familiar reducido llevado a cabo en la presente tesis sugiere la determinación genética de los niveles de APC puesto que en algunos casos el fenotipo “bajo nivel de APC” muestra un patrón hereditario. Esta observación parece contradecir los resultados que muestran que no existe diferencia en el OR entre pacientes con o sin historia familiar de trombosis. Por tanto, para constatar la determinación genética de los niveles de APC se requieren estudios familiares y análisis genéticos más exhaustivos. Por otro lado, el hecho de no encontrar una clara asociación entre los bajos niveles de APC y el TEV en nuestro estudio familiar (ver *Figura 4.6* en Resultados), apoya el concepto de trombosis como enfermedad multifactorial y la posible implicación de otros defectos genéticos y/o adquiridos.

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la expresión del gen de la trombomodulina y del gen del EPCR puede ser modificada por la endotoxina, la IL-1 o el TNF- $\alpha$  (51, 129-133, 222). La variación en los niveles de APC observada en algunos pacientes a lo largo del tiempo, apoya la posible existencia de una reducción transitoria en la expresión de los dos receptores celulares involucrados en la activación de la proteína C. Es posible que algunos pacientes con TEV sean portadores de polimorfismos en los genes que codifican para estos receptores que los hagan más susceptibles a la regulación a la baja por parte de la endotoxina, la IL-1 o el TNF- $\alpha$ . Por tanto, es posible que algunas enfermedades subyacentes, tales como infecciones, ocasionen una disminución temporal de la expresión de estos receptores que podría contribuir a la reducción de la concentración de APC circulante observada y al aumento del riesgo de trombosis. A su vez, podría explicar las variaciones longitudinales en los niveles de APC observadas en algunos pacientes con TEV y bajos niveles de APC.

El ensayo para la determinación de la APC utilizado en este estudio se basa en la estimulación, por parte de la heparina, de la formación de complejos entre la APC circulante y el PCI plasmático. En plasma normal, más del 95% de la APC forma complejos con el PCI en presencia de heparina (367). Sin embargo, algunas condiciones clínicas pueden reducir la formación de complejos entre la APC y el PCI, dando lugar a falsos niveles reducidos de APC. Por ejemplo, niveles de PCI en plasma extremadamente reducidos (< 10%) o niveles de  $\alpha_1$ AT muy aumentados (> 200%) podrían dar lugar a una disminución de la formación de complejos APC:PCI en el ensayo de APC (365) y, por tanto, a una reducción de los niveles de APC circulante cuantificados con nuestro ensayo. Asimismo, el plasma de los pacientes con TEV podría contener factores que inhibieran la formación de complejos entre la APC y el PCI, o que inhibieran directamente a la APC *in vitro* explicando, por tanto, los niveles reducidos de APC observados. La primera hipótesis puede ser descartada puesto que todos los pacientes con TEV mostraron niveles de PCI funcional (70 – 139%) y niveles de  $\alpha_1$ AT (72 – 173%) dentro del rango normal. Para excluir la posibilidad de que algunos componentes del plasma de los pacientes con TEV bloquearan la formación de complejos APC:PCI o inhibieran a la APC *in vitro*, seleccionamos 30 pacientes con TEV y niveles reducidos de APC (< 0,77 ng/ml) y añadimos APC purificada a las muestras de plasma. En todos los casos, la recuperación de la APC añadida al plasma conteniendo heparina fue del 91 al 108%, mientras que la recuperación de la APC añadida al plasma conteniendo el cóctel de inhibidores fue prácticamente indetectable. Estos resultados descartan que la formación de complejos entre la APC y el PCI *in vitro* estuviera bloqueada en estos pacientes con bajos niveles de APC y, a su vez, descartan procesos de activación de la proteína C o inhibición de la APC *in vitro*.



Nuestros resultados parecen contradecir aquellos descritos previamente (408, 440). Faioni y col. (440) estudiaron el ratio APC/proteína C en individuos portadores de un defecto genético en la ruta anticoagulante con o sin historia de trombosis y, a diferencia de nuestros resultados, no encontraron ningún paciente con el ratio APC/proteína C por debajo del límite más bajo del rango normal. Por el contrario, observaron que el 16% de los pacientes presentaban ratios APC/proteína C por encima del límite superior del rango normal. Esta discrepancia podría ser debida a la diferencia poblacional entre los pacientes estudiados. A diferencia de nuestros pacientes, todos los pacientes estudiados por Faioni y col. (440) eran portadores de un factor de riesgo genético para el TEV. Este hecho apoya la hipótesis de que nuestros pacientes sean portadores de algún defecto en la ruta de activación de la proteína C y, en consecuencia, presenten niveles de APC circulante reducidos. A su vez, observaron que los pacientes con TEV sin ningún factor de riesgo trombofílico congénito o adquirido excepto la hiperhomocisteinemia, mostraban niveles de APC significativamente más altos que los controles ( $124 \pm 32\%$  vs  $116 \pm 20\%$ ) (440). Sin embargo, como indican los autores, esta diferencia fue principalmente debida a los pacientes con hiperhomocisteinemia, quienes mostraron niveles de APC en plasma significativamente más elevados que los individuos control. De hecho, no observaron diferencias significativas en los niveles de APC entre los pacientes con TEV con niveles normales de homocisteína y los controles. Desafortunadamente, nosotros no hemos medido los niveles de homocisteína en nuestros pacientes, pero una prevalencia distinta en la homocisteinemia podría explicar algunas de estas diferencias para los niveles elevados de APC. Respecto a los bajos niveles de APC observados en nuestros pacientes pero no en aquellos descritos por Cattaneo y col. (408), las diferencias podrían ser debidas a la utilización de un ensayo diferente para la determinación de la APC. En los dos trabajos que discrepan con nuestros resultados (408, 440), se utilizó el ensayo amidolítico descrito por Gruber y Griffin (435). Nosotros hemos descrito previamente la existencia de una buena correlación entre este ensayo y nuestro ensayo (365). Sin embargo, en nuestras manos el ensayo amidolítico falla a la hora de medir de manera precisa los niveles más bajos de APC, de manera que sobreestima los niveles de APC por debajo de 0,6 ng/ml. Una posible causa de estas discrepancias sería que en el ensayo amidolítico las muestras con bajo nivel de APC deben ser incubadas con el sustrato cromogénico en cámara fría durante más de 30 días. Alternativamente, la prevalencia de bajos niveles de APC en nuestra población podría ser mayor que en otras poblaciones. De hecho, cuando los pacientes y controles con niveles de APC por debajo del percentil 5% de la población normal fueron excluidos, el nivel medio de APC en los pacientes con TEV (1,17 ng/ml; n = 122) no fue significativamente diferente al nivel medio de los controles (1,22 ng/ml; n = 189).

En conclusión, un nivel reducido de APC circulante en individuos sin ningún defecto trombofílico conocido constituye un importante factor de riesgo prevalente e independiente para el TEV. Sin embargo, sería de especial interés realizar estudios que permitan contrastar todas las hipótesis planteadas anteriormente y permitan identificar el mecanismo biológico que ocasiona esta reducción en los niveles de APC. Uno de estos estudios se discute a continuación.

### **5.3 BÚSQUEDA DE NUEVAS MUTACIONES EN LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C**

En la presente tesis, presentamos el diseño y evaluación de una nueva estrategia para identificar la presencia de mutaciones en los genes que codifican para las proteínas que forman el complejo de activación de la proteína C y que podrían explicar los niveles reducidos de APC circulante observados en pacientes con TEV. Puesto que la trombomodulina y el EPCR son proteínas integrales de membrana, sus valores plasmáticos no pueden ser empleados como método para detectar deficiencias en las mismas. Por lo tanto, sería de especial interés disponer de un método que nos permitiera valorar el estado de activación del sistema anticoagulante de la proteína C, y poder aplicarlo para la selección de pacientes con historia de trombosis que fueran portadores de mutaciones funcionales en los genes que codifican para el EPCR y la trombomodulina, fundamentalmente. La presencia de mutaciones funcionales en los genes que codifican para el EPCR y la trombomodulina afectarán a la tasa de activación de la proteína C y, por tanto, a los niveles de APC circulante. Hemos desarrollado un método sencillo para la determinación de los niveles de APC, y hemos observado que la presencia de niveles reducidos de APC constituye un factor de riesgo prevalente e independiente de TEV. Como hemos indicado anteriormente, los niveles reducidos de APC pueden ser el resultado de diversos mecanismos fisiopatológicos, tanto hereditarios como adquiridos. Así, los niveles reducidos de APC observados en algunos pacientes con TEV podrían ser explicados por la presencia de mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas. Por lo tanto, la selección previa de aquellos pacientes con trombosis que presenten niveles de APC circulante reducidos, incrementaría la probabilidad de identificar mutaciones funcionales en los componentes de la ruta de activación de la proteína C como son el EPCR, trombomodulina, protrombina y proteína C.

Siguiendo esta estrategia, seleccionamos 26 pacientes con historia de TEV y niveles de APC reducidos de forma persistente y, mediante secuenciación directa, analizamos la región codificante y los límites intrón-exón del gen del EPCR, trombomodulina, protrombina y proteína C. De esta forma identificamos diversas mutaciones nuevas o ya descritas en la bibliografía, algunas de las cuales se estudiaron más exhaustivamente. Los resultados obtenidos avalan firmemente el empleo de esta estrategia para la búsqueda de mutaciones que modulen el mecanismo de activación de la proteína C.

### **5.3.1 MUTACIONES EN EL GEN DEL EPCR**

Al inicio de esta tesis doctoral, no se había descrito la existencia de mutaciones en el gen que codifica para el EPCR, por lo que la búsqueda de las mismas se convirtió en uno de los objetivos principales de este estudio. Sin embargo, desde entonces, se ha descrito un conjunto de mutaciones en este gen, así como la presencia de anticuerpos anti-EPCR, que sugieren un papel relevante del receptor dentro del sistema anticoagulante de la proteína C.

La primera mutación consiste en una inserción de 23 pb en el nucleótido 4031 del exón 3 del gen, duplicando las 23 pb anteriores, lo que genera un codón de parada prematuro en el sexto codón posterior al punto de inserción (Arg96 de la proteína madura) (413). Esto da lugar a la síntesis de una proteína truncada a la cual le falta parte de la región extracelular, todo el dominio transmembrana y la cola citoplasmática, siendo incapaz de potenciar la activación de la proteína C (mutación de pérdida de función). La inserción fue identificada tanto en pacientes con TEV o infarto de miocardio, como en controles, considerándose un factor de riesgo para TEV y, posiblemente, para infarto de miocardio. Estudios posteriores han intentado establecer una asociación entre la mutación y el riesgo de trombosis venosa y arterial pero, hasta el presente, ha sido imposible establecer una asociación de forma significativa debido a la baja frecuencia alélica de la mutación (411, 441-448). A su vez, Franchi y col. (409) estudiaron un grupo de mujeres con historia de aborto tardío idiopático e identificaron la inserción en una paciente, aunque la frecuencia en este grupo de pacientes fue similar a la del grupo control. La posible funcionalidad de esta mutación en el gen del EPCR es apoyada por la observación de que la disrupción del gen del EPCR causa la muerte embrionaria temprana en ratones (69). Aunque el análisis estadístico no reveló la existencia de una asociación significativa entre la mutación y la enfermedad, estudios de expresión en células 293T mostraron que la proteína truncada no se localiza en la superficie celular, no puede ser secretada al medio extracelular y no se une a la APC,

sugiriendo que la inserción conllevaría una menor cantidad de EPCR funcional en el endotelio y, por lo tanto, una menor activación de proteína C, con lo que la inserción de 23 pb constituiría un factor de riesgo de trombosis venosa y arterial (449). Además, la presencia de esta mutación parece estar restringida a poblaciones del sur de Europa o Italianas (450). De hecho, la variación étnica en la prevalencia de los factores de riesgo hemostáticos entre diferentes poblaciones es un hecho común (451, 452) y, posiblemente, la inserción de 23 pb en el gen del EPCR presenta una distribución geográfica variable, como ocurre con la mutación factor V Leiden y el polimorfismo G20210A de la protrombina.

Merati y col. (413) describieron la presencia del polimorfismo T3997C situado en el intrón II del gen del EPCR, cuya frecuencia alélica era similar en un grupo de pacientes con infarto de miocardio, en un grupo de pacientes con TEV y en un grupo control (0,59 para el alelo T y 0,41 para el alelo C). Estudios posteriores han encontrado una distribución alélica similar para este polimorfismo (411, 412, 446, 450).

Simmonds y Lane (290) y Merati y col. (413) describieron la presencia del polimorfismo A4600G situado en el exón 4 del gen, que produce el cambio de aminoácido Ser219Gly en la región transmembrana del receptor. La frecuencia alélica del polimorfismo en el grupo de 203 pacientes con infarto de miocardio fue de 0,82 para el alelo A y de 0,18 para el alelo G, mientras que en los 97 controles las frecuencias alélicas fueron 0,89 y 0,11, respectivamente. En estudios posteriores se han observado resultados heterogéneos: una distribución alélica similar a ésta (446); una ligera disminución de la frecuencia del alelo mutado en un grupo control (411), discrepancia que podría ser debida a la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas; o una frecuencia similar en un grupo de pacientes con TEV y en un grupo control (412).

Merati y col. (413) describieron la presencia de una mutación silenciosa en el exón 3 del gen del EPCR, C4237T.

Simmonds y Lane (290) describieron en la secuencia nucleotídica del gen del EPCR humano la presencia de la potencial sustitución T2532C en el intrón I. Saposnik y col. (411) analizaron la frecuencia de este polimorfismo en 100 individuos sanos, y obtuvieron una frecuencia de 0,52 para el alelo T y de 0,48 para el alelo C.

A su vez, se ha descrito la presencia de mutaciones en la región promotora del gen: T-318G (409); T-377C, C-342T, C-313T y G-290C (410), aunque estudios *in vitro* no mostraron una disminución en la actividad del gen utilizado en condiciones basales, no pudiendo demostrar el papel de estas mutaciones en la regulación del gen del EPCR.

Respecto al polimorfismo G4678C descrito primeramente por nosotros (421), no se ha observado una asociación entre este polimorfismo y el riesgo de TEV en la

población irlandesa (453) ni francesa (411). Recientemente, se ha observado un ligero descenso del riesgo de TEV en los individuos portadores del alelo 4678C (frecuencias alélicas de 0,64 para el alelo G y 0,36 para el alelo C en el grupo de pacientes, y de 0,61 y 0,39 respectivamente en el grupo de controles) (412).

Hermida y col. (414) identificaron el polimorfismo C4031T, que produce el cambio de aminoácido Arg113Cys en el exón 3 del gen, con una frecuencia similar en un grupo de pacientes con TEV y de controles sanos. Tras su caracterización, concluyeron que el polimorfismo C4031T no modifica la estabilidad ni la funcionalidad del receptor, dando lugar a una variante natural del receptor, por lo que no está asociado con un mayor riesgo trombótico.

Además de los polimorfismos ya indicados, analizando la secuencia completa del gen del EPCR de 48 individuos sanos de origen francés, Saposnik y col. (411), identificaron los siguientes cambios: C-685G en la región promotora del gen; los SNPs T1274C, C1451T, G1541A, G1880C/A y T2078C en el intrón I; los SNPs G2897A, T3424C y G3810A en el intrón II; y los SNPs C5630G, A5632G y G5663A en la región 3' no traducida del gen. Las frecuencias alélicas de los polimorfismos eran mayores de 0,05, excepto para los alelos 2078C y 3810A (0,041 y 0,036, respectivamente).

Uitte de Willige y col. (412) han descrito la existencia de un cuarto haplotipo en el gen del EPCR caracterizado por los polimorfismos T2078C y G3811A. Estudiaron un conjunto de 471 pacientes con TEV y 471 controles sanos procedentes del estudio LETS en Holanda, observando frecuencias de 0,93 para el alelo T/G y 0,07 para el alelo C/A en el grupo de pacientes, y de 0,95 y 0,05 respectivamente en el grupo de controles. Así, tanto los individuos homocigotos como los heterocigotos para este haplotipo tenían un riesgo de TEV ligeramente aumentado al compararlos con los individuos no portadores de estos polimorfismos (OR = 1,4; IC 95% 1,0 – 2,2).

Hurtado y col. (454) encontraron un marcado aumento de anticuerpos anti-EPCR en mujeres con pérdida fetal, sugiriendo que la presencia de dichos anticuerpos puede ser un factor de riesgo independiente de un primer episodio de muerte fetal.

En nuestro estudio, al analizar el gen que codifica para el EPCR identificamos 2 mutaciones en el intrón II: la delección de una G en posición 2847, a +47 del sitio de splicing en 5' del intrón II identificada en 1 control, y el polimorfismo G2876A en +76 de este sitio de splicing. Tanto la posición como la frecuencia sugieren que estos dos cambios no están asociados con un mayor riesgo trombótico. Respecto a la inserción de 23 pb en posición 4031 que genera un codón de parada prematuro, en nuestro estudio únicamente hemos identificado esta inserción en 1 control, por lo que no podemos analizar su asociación con el TEV. El polimorfismo A4600G que da lugar a un cambio de aminoácido de Serina a Glicina en el residuo 219 de la región transmembrana del

receptor, no parece estar asociado con un mayor riesgo trombótico. Finalmente, identificamos un grupo de polimorfismos que están en desequilibrio de ligamiento: T2532C situado en posición -16 del sitio de splicing en 3' del intrón I; el polimorfismo G2897A situado en posición +97 del sitio de splicing en 5' del intrón II; el polimorfismo T3997C situado en posición -20 del sitio de splicing en 3' del intrón II, y el polimorfismo G4678C en la región 3' UTR a +17 del codón de parada de la traducción. Hemos observado que este grupo de ligamiento está asociado con una disminución del riesgo trombótico aunque, sin llevar a cabo estudios de expresión y funcionalidad de la proteína, no podemos concluir cual de ellos debe ser responsable de este efecto protector. Sin embargo, los polimorfismos T2532C y T3997C están lo suficientemente cerca de los límites intrón - exón como para sugerir posibles diferencias en la eficiencia de splicing. Asimismo, el polimorfismo G4678C situado en la región 3' no traducida podría modificar la diana de algún factor de transcripción, conllevando una mayor estabilidad del mRNA y una mayor síntesis proteica. Al analizar la presencia de potenciales sitios de unión de factores de transcripción en presencia del alelo normal 4678G y del alelo mutado C, observamos que el nucleótido polimórfico forma parte de la secuencia *core* de 3 factores de transcripción: ATF (Factor de Transcripción Activador), AP-1 (Proteína 1 Activador) y TCF11 (Factor de Transcripción 11). Así, en presencia del alelo mutado C las secuencias diana se modifican impidiendo la unión de estos factores de transcripción. El factor de transcripción AP-1 es regulado a la baja por glucocorticoides a través de la interacción directa con eritrocitos, y es inducido por el inductor de tumores TPA. El factor TCF11 regula la expresión de diversos genes humanos como el de la globina A su vez, este nucleótido está muy próximo a los sitios de unión de otros factores de transcripción como el represor transcripcional GFI1 (Factor de Crecimiento Independencia 1), y el factor Pbx-1 que actúa como cofactor de la mayoría de proteínas homeodominio convirtiéndose en un activador transcripcional constitutivo. Aunque la presencia del alelo mutado no impide la unión de estos factores de transcripción a su secuencia diana, sería posible que modificara la interacción. Estos datos apuntan un posible papel regulador del polimorfismo G4678C en la síntesis del EPCR, aunque deberían realizarse estudios más exhaustivos sobre el papel de estos factores de transcripción en la expresión del EPCR y la posible alteración de sus dianas en presencia del alelo 4678C, mediante estudios de expresión y de movilidad electroforética con extractos nucleares. Respecto a los polimorfismos situados en regiones reguladoras del gen, a continuación analizaremos su posible papel a través de polimorfismos identificados en otros genes cuyos efectos han sido estudiados en mayor profundidad.

### 5.3.2 MUTACIONES EN EL GEN DE LA TROMBOMODULINA

Asimismo, durante el transcurso de esta tesis se han descrito diversas mutaciones en el gen de la trombomodulina. Kunz y col. (418) describieron una sustitución G1686C (Val544Val) y la inserción insT1689 en 1 de los 104 pacientes con infarto de miocardio estudiados. La proteína mutada presenta una secuencia normal para la región extracelular y el dominio transmembrana, pero presenta una cola citoplasmática elongada en el extremo C-terminal, a causa de la sustitución de los 12 aminoácidos correspondientes por 61 residuos anormales. Los individuos portadores de la inserción presentan una menor expresión de trombomodulina en la superficie de monocitos y menores niveles de trombomodulina soluble en plasma. Estudios en células COS-7 mostraron una menor expresión de trombomodulina en la superficie celular por acumulación de la proteína mutada cerca del núcleo, así como una menor capacidad de activación de la proteína C en las células que expresaron la trombomodulina mutada.

Franchi y col. (409) encontraron 3 mutaciones nuevas en 4 mujeres con abortos tardíos idiopáticos: G-201A en la región promotora del gen, G1208A (Arg385Lys) en el cuarto dominio tipo *EGF*, C282G (Pro136Pro) en la región N-terminal del dominio tipo lectina. Asimismo, Faioni y col. (455) encontraron la mutación G-201A en pacientes con historia de TEV recurrente a edad temprana e historia familiar de trombosis. Se desconoce el significado funcional de la mutación, puesto que no se ha observado una disminución en la expresión del gen en presencia de la mutación (311).

Al analizar la región promotora distal del gen de la trombomodulina en pacientes con TEV (nucleótidos -300 a -2052), Le Flem y col. (416) encontraron 8 mutaciones nuevas: C-1848G, G-1799C, G-1748C, del-1209/-1208TT, G-1166A, C-1084T, del-1079/1078CC, C-797G. Los polimorfismos más frecuentes fueron G-1748C y del-1209/-1208TT. El polimorfismo G-1748C crea un potencial sitio de unión del factor de transcripción Sp1 con una única base diferente a la secuencia consenso. La delección está asociada con la presencia de venas varicosas en los pacientes, y está en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo C1418T (Ala455Val), lo cual podría sugerir una relación entre este polimorfismo y la enfermedad. La transición G-1166A podría ser funcional puesto que modifica el *core* de la secuencia diana del factor de transcripción SSRE (*shear stress-responsive element*), pero no se observó asociación de ninguna de las 3 mutaciones con trombosis. Konstantoulas y col. (456) analizaron la presencia de estas 4 variantes potencialmente funcionales de la trombomodulina en dos grupos de pacientes con infarto de miocardio procedentes del norte y del sur de Europa. No encontraron asociación entre el polimorfismo G-1748C y un mayor riesgo de infarto de miocardio en ninguna de las dos poblaciones, mientras que observaron un incremento de 1,6 veces del riesgo de infarto de miocardio para el haplotipo de la

trombomodulina Val/delTT en la población del norte de Europa pero no en la del Sur. Además, observaron una interacción entre este haplotipo y la obesidad en la población del norte. A su vez, la frecuencia de la mutación G-1166A fue muy baja en los controles del norte de Europa y 10 veces más alta en el Sur, por lo que no pudieron calcular el riesgo para esta variante.

Kunz y col. (304) identificaron 2 nuevas mutaciones: del791-801 que da lugar a STOP306, y G1209T (Arg385Ser). Estudios de expresión en células COS-7 mostraron la existencia de transcripción del alelo portador de la delección. Sin embargo, la proteína mutada parecía formar agregados o estar asociada con el citoesqueleto, sugiriendo que la expresión y función de la trombomodulina en la superficie endotelial del paciente sería del 50%, la cual procedería únicamente del alelo normal, hipótesis respaldada por los bajos niveles de trombomodulina soluble observados en 2 individuos portadores de la mutación. La mutación Arg385Ser también dio lugar a una reducción del 50% en la expresión y a un incremento de 4 veces en la Km, lo que afectaría a su actividad como cofactor.

Recientemente, Öhlin y col. (417) han identificado 10 mutaciones puntuales y 2 delecciones en la región promotora del gen de la trombomodulina en un grupo de pacientes con infarto de miocardio y en individuos sanos: C-1861A, C-1852G, G-1803C, G-1752C, del-1213/1212TT, C-1089G, C-1088T, del-1083/1082CC, A-1066C, C-801G, A-651C, G-52A. Solamente las mutaciones G-1752C y del -1213/1212TT son frecuentes en pacientes y en controles, y parecen estar asociadas con un menor riesgo de infarto de miocardio en fumadores. Así, no han encontrado evidencias que apoyen la hipótesis de que las mutaciones en el gen de la trombomodulina confieran un mayor riesgo de infarto de miocardio o de muerte.

En nuestro estudio, al analizar el gen que codifica para la trombomodulina en el grupo de pacientes con TEV y en los controles, no encontramos ningún individuo portador de las mutaciones descritas por otros grupos en este gen. Estas observaciones sugieren que la frecuencia de las mutaciones en el gen de la trombomodulina es muy baja, al menos en nuestra población. Únicamente encontramos individuos portadores del polimorfismo C1418T que produce un cambio de Alanina a Valina en el aminoácido 455 situado en el sexto motivo *EGF* del receptor, región que interviene en la interacción con la proteína C y, por lo tanto, esencial para la generación de APC. En contraposición a los resultados descritos en estudios previos que sugieren un posible papel del polimorfismo en la trombosis arterial y un papel neutro respecto de la trombosis venosa, nosotros hemos observado que el alelo 1418T es más frecuente en los controles que en los pacientes con TEV, lo que sugiere que el polimorfismo C1418T podría conferir un



efecto protector frente al TEV en nuestra población, posiblemente debido a su asociación con niveles elevados de APC.

Sin embargo, a excepción del polimorfismo C1418T, las mutaciones en el gen de la trombomodulina son muy poco frecuentes y, posiblemente, funcionalmente irrelevantes, incluso en grupos de pacientes altamente seleccionados (311). Este hecho respaldaría los resultados obtenidos en nuestro estudio, puesto que no hemos encontrado ninguna mutación nueva en el gen de la trombomodulina en el grupo de pacientes seleccionados con historia de TEV y con niveles muy bajos de APC, firmes candidatos a ser portadores de alguna mutación funcional responsable de una reducida activación de la proteína C. Posiblemente, una explicación de la baja la frecuencia de mutaciones que dan lugar a una pérdida de función de la trombomodulina sea porque interfieran con la reproducción y el desarrollo embrionario o disminuyan la respuesta inmune frente a infecciones.

### 5.3.3 MUTACIONES EN EL GEN DE LA PROTROMBINA

El objetivo de nuestro estudio fue identificar mutaciones responsables de una génesis deficiente de APC. Al analizar la región codificante y parte de las regiones reguladoras e intrónicas flanqueantes del gen de la protrombina, en aquellos pacientes con TEV con niveles muy reducidos de APC y en controles, de todas las mutaciones encontradas ninguna de ellas, bien por su localización y/o por no existir diferencias en su distribución entre ambos grupos de individuos, parecía estar asociada *a priori* con una alteración en los niveles de proteína circulante. Así, la mayor parte de las mutaciones identificadas están situadas en regiones intrónicas o no dan lugar a un cambio de aminoácido en la proteína.

El polimorfismo C709T está situado a +82 del sitio de splicing en 5' del intrón II, y la frecuencia del alelo mutado en los pacientes con TEV es del 3,7%. El polimorfismo C1260G está a -26 del sitio de splicing en 3' del intrón II, y su distribución en pacientes y controles es muy similar (1% y 1,4%, respectivamente). El polimorfismo T1462C está a -91 del sitio de splicing en 3' del intrón III, y la frecuencia del alelo mutado C es casi el doble en pacientes (12,7%) que en controles (7,4%), aunque esta diferencia no es significativa. Por el contrario, el polimorfismo G1639A situado a +35 del sitio de splicing en 5' del intrón IV, es más frecuente en controles (14,7%) que en pacientes (8%), aunque las diferencias tampoco son significativas.

El polimorfismo C4125G está situado en posición -7 del sitio de splicing en 3' del intrón V, modificando la secuencia consenso de splicing, lo que podría alterar el

correcto procesamiento del mRNA. En el grupo de pacientes con TEV, la frecuencia del alelo mutado 4125G es del 22,2%; sin embargo, no podemos analizar la asociación de este cambio con el TEV, puesto que no hemos estudiado su presencia en el grupo control. El polimorfismo C4189T situado en el exón 6 no modifica la Prolina en posición 117, y la frecuencia del alelo mutado en los pacientes es del 1,9%. Por el contrario, el polimorfismo C4203T situado en el exón 6, da lugar a un cambio de aminoácido de Treonina a Metionina en el residuo 122 y la frecuencia del alelo mutado en el grupo de pacientes es del 3,7%. Sin embargo, no hemos analizado su presencia en el grupo control. Los datos preliminares de estos dos polimorfismos sugieren la conveniencia de estudiar su presencia en un mayor número de pacientes y controles para establecer si son o no funcionales.

El polimorfismo C6890T en el exón 7 no modifica la Glicina 238, y la distribución del polimorfismo entre pacientes y controles es muy similar (1% y 0%, respectivamente). El polimorfismo C7177T está a -69 del sitio de splicing en 3' del intrón VII pero, dada su frecuencia en el grupo de pacientes, parece tratarse de un error en la secuencia de referencia puesto que el 96,2% de individuos son portadores del genotipo TT. El polimorfismo G8845A en el exón 10 no modifica la Prolina 368, y la frecuencia entre pacientes con TEV y controles es muy similar (9,8% y 10,7%, respectivamente). El polimorfismo G10253A en el exón 12 no modifica la Prolina en posición 491, y la frecuencia del alelo mutado en los pacientes con TEV es muy baja (1,9%). El polimorfismo A19911G está situado a +87 del sitio de splicing en 5' del intrón XIII, y la frecuencia del alelo mutado 19911G en los pacientes con TEV es ~1,7 veces mayor que el alelo 19911A (63,5% y 36,5%, respectivamente). El polimorfismo C20068T en el exón 14 no modifica la Arginina 565, y la frecuencia de ambos alelos es muy similar en pacientes y controles (1% y 0%, respectivamente). Finalmente, el polimorfismo G20210A está situado en la región 3' no traducida, más concretamente en el sitio de corte del mRNA poliadenilado. No encontramos ningún paciente con TEV portador del polimorfismo, como era de esperar dada la selección previa de los individuos incluidos en el estudio, en el que hemos excluido aquellos portadores de mutaciones trombofílicas conocidas, incluido el polimorfismo G20210A. La frecuencia del alelo 20210A observada en el grupo control fue del 2%.

Por otro lado, al estudiar un grupo de pacientes con infarto de miocardio identificamos 2 nuevos sitios polimórficos en el gen de la protrombina. El polimorfismo C6860T situado en el exón 7, que no modifica la Glicina en posición 228, fue identificado en heterocigosis en 1 de los 4 pacientes con infarto de miocardio estudiados, no estando presente en los 50 pacientes con TEV ni en los 44 controles. Asimismo, al estudiar un grupo de 31 pacientes con infarto de miocardio identificamos 1 paciente homocigoto para el polimorfismo G8921C, no estando presente en los 46

pacientes con TEV ni en los 42 controles estudiados. Este cambio está situado en posición +10 del sitio de splicing en 5' del intrón X, posición muy cercana a la secuencia consenso. Nuestros resultados indican que estos cambios no estarían asociados con la trombosis venosa, aunque sería interesante analizar su posible papel en la síntesis y/o funcionalidad de la proteína y su posible asociación con el riesgo de trombosis arterial.

Se han descrito 39 mutaciones en el gen de la protrombina que dan lugar a deficiencias de protrombina, disprotrombinemia, hipoprotrombinemia, niveles elevados de protrombina en plasma, o trombosis venosa, las cuales están recogidas en la *Human Gene Mutation Database*. De todas ellas, nosotros únicamente hemos encontrado el polimorfismo A19911G (318), situado en el intrón XII y asociado con niveles elevados de protrombina en plasma, y el polimorfismo G20210A (324), situado en la región 3' no traducida y asociado con niveles elevados de protrombina y un mayor riesgo de trombosis venosa. Zivelin y col. (457) observaron que el alelo 20210A está en fuerte desequilibrio de ligamiento con el alelo 19911A, por lo que la coexistencia de ambos polimorfismos podría incrementar el riesgo trombotico (458), aunque estudios de análisis de ligamiento demostraron que el polimorfismo G20210A es, por él mismo, funcional y responsable de los niveles elevados de protrombina (459). Cabe destacar, que en nuestro estudio no hemos observado ligamiento entre los polimorfismos A19911G y G20210A.

Recientemente, von Ashen y col. (460) han observado que el polimorfismo A19911G es funcional, puesto que altera un motivo pentamérico funcional, modificando la eficiencia del splicing de este intrón. Por otro lado, en nuestro estudio hemos identificado el polimorfismo C1260G en el intrón II. Interesantemente, Poort y col. (461) han descrito el polimorfismo C1261G en el nucleótido contiguo, el cual está asociado con hipoprotrombinemia. Ambos polimorfismos dan lugar a la introducción de una purina adicional dentro del grupo de pirimidinas en el sitio aceptor de splicing del intrón II. Algunos sitios aceptores de splicing son más susceptibles al efecto de la pérdida de pirimidinas que otros, en función de la longitud del grupo de pirimidinas (462). La secuencia nucleotídica alrededor del nucleótido 1260, muestra la presencia de 2 AGs en las posiciones 1258/1259 y 1270/1271, antes de la AG del sitio de splicing actual. Así, al igual que ocurre con el cambio C1261G, el cambio C1260G podría generar un nuevo mecanismo de splicing, con la introducción de un sitio aceptor de splicing alternativo en el intrón II. Este proceso daría lugar a un corrimiento en la pauta de lectura y a la aparición de un codón de parada prematuro justo después del sitio mutado, independientemente de cual de los 2 AGs fuera utilizado en este nuevo mecanismo de splicing. Este defecto en el splicing, podría dar lugar a un transcrito carente del exón 3, lo que volvería a dar lugar al corrimiento de la pauta de lectura

(461). Para esclarecer el posible efecto transcripcional de la presencia de ese polimorfismo, se deberían realizar estudios del mRNA de los individuos portadores.

En definitiva, dada la localización o la relevancia en la secuencia de la proteína de la mayor parte de las mutaciones encontradas en el gen de la protrombina, no las consideramos firmes candidatas a ser responsables de una génesis deficiente de APC y de los episodios trombóticos de nuestros pacientes con los niveles más bajos de APC. Queda un reducido número de polimorfismos que necesitan un estudio adicional para valorar su posible asociación con el riesgo de trombosis.

### **5.3.4 MUTACIONES EN EL GEN DE LA PROTEÍNA C**

Al estudiar el gen que codifica para la proteína C identificamos 4 mutaciones: A-1476T, G1435A (Glu16Lys), T3342G (Ser99Ser), y T7228C (Asp214Asp). El polimorfismo A-1476T está localizado en la región 5' UT, y los polimorfismos T3342G y T7228C no dan lugar a un cambio de aminoácido en la proteína madura. Spek y col. (463) han descrito que la presencia del polimorfismo A-1476T en homocigosis, junto con los polimorfismos T-1654C y A-1641G, está asociada con niveles reducidos de proteína C y un incremento del riesgo trombótico. En nuestro estudio no analizamos la región del promotor que incluye estos dos sitios polimórficos, por lo que no podemos confirmar el ligamiento de los 3 polimorfismos.

Se han descrito 232 mutaciones en el gen de la proteína C que dan lugar a deficiencias de proteína C o la reducción de los niveles de proteína plasmáticos, las cuales están recogidas en la *Human Gene Mutation Database*. No hemos encontrado ninguna de estas mutaciones en nuestro estudio. Ireland y col. (464) han descrito una doble mutación en el triplete que codifica el aminoácido Ser99: C3341A y T3342G (TCT a TAG). La presencia de ambos alelos mutados modifica el aminoácido Ser99 dando lugar a un codón de parada prematuro, lo cual está asociado con una deficiencia de proteína C. En nuestros pacientes, únicamente encontramos la mutación T3342G, por lo que no se produce un cambio en este aminoácido.

Finalmente, la mutación G1435A en el exón 3 del gen de la proteína C produce un cambio de aminoácido de Glutámico a Lisina en el residuo 16 de la proteína. Esta mutación fue identificada en una paciente con TEV y niveles muy reducidos de APC, y es privativa de su familia. El aminoácido Glu16 es el cuarto residuo del dominio Gla de la proteína, dominio esencial para su funcionalidad, por lo que postulamos que la presencia de la isoforma 16Lys podría modificar la conformación de este dominio. Ello podría alterar la capacidad de la proteína para unirse a las superficies fosfolipídicas

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

cargadas negativamente y, por lo tanto, reducir sus funciones anticoagulantes, lo que podría explicar el episodio trombótico de la paciente. Al analizar la presencia de la mutación en los familiares de nuestra paciente, observamos que los dos familiares que habían sufrido episodios trombóticos eran portadores de la mutación G1435A. A su vez, identificamos 2 miembros (hermanas) portadores sin historia de TEV, posiblemente debido a su corta edad, por lo que sería recomendable realizar un seguimiento de los mismos para poder detectar un posible desarrollo de la enfermedad. Para caracterizar la proteína C mutada, determinamos los niveles antigénicos de proteína C (*Aserachrom PC kit*, Diagnostica Stago), la actividad amidolítica (*Stachrom PC kit*, Diagnostica Stago) y la actividad anticoagulante (*Staclot PC kit*, Diagnostica Stago). Los individuos portadores de la mutación mostraron niveles normales de proteína C antigénica y de actividad amidolítica, mientras que su actividad anticoagulante estaba disminuida. Para analizar la conformación del dominio Gla de la proteína mutada, estudiamos su capacidad de unión a dos anticuerpos anti-proteína C monoclonales. Estos anticuerpos reconocen un epítipo en el dominio Gla de la proteína C en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . En presencia de la mutación, la unión de la proteína C mutada a los anticuerpos se redujo significativamente, lo que sugiere un cambio conformacional en el dominio Gla de las moléculas portadoras de la mutación que impide el reconocimiento por los anticuerpos. Diversos estudios han descrito la existencia de mutaciones en los aminoácidos que componen el dominio Gla de la proteína C. Los cambios Leu5Gln (465), Glu7Asp (466), Arg9His (467), Arg15Gly (468), Arg15Trp (469-471), Glu20Ala (472, 473), Glu26Lys (474), dan lugar a deficiencias de proteína C tipo II, es decir, niveles antigénicos normales, actividad amidolítica normal, actividad anticoagulante reducida y una conformación de la proteína anormal, demostrada mediante diferentes ensayos de su actividad dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$ . Zhang y col. (475-479) prepararon variantes recombinantes de proteína C con la modificación de Glutámico a Aspártico en los residuos esenciales del dominio Gla (posiciones 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26 y 29). Tras purificar las proteínas mediante cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad en una columna anti-proteína C humana y activarlas con la proteasa de veneno de serpiente Protac C, estudiaron la actividad anticoagulante de cada variante de la proteína C nativa como el grado de prolongación del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) con plasma humano deficiente en proteína C, y mediante ensayos de inactivación de los factores Va y VIII en el sistema protrombinasa y tenasa, respectivamente. Observaron que la falta de un solo residuo Gla en posición 7, 16, 20 o 26 daba lugar a la desaparición completa de la actividad anticoagulante dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , la eliminación de Gla 25 y 29 dio lugar a una importante reducción de la actividad, mientras que la eliminación de un residuo Gla en posición 6, 14 o 19 mantuvo suficiente actividad anticoagulante, comparada con la proteína C nativa. Los autores de este estudio consideran que el cambio a cualquier otro tipo de aminoácido en estas

posiciones dará lugar una pérdida de actividad similar a la observada. Cabe destacar que la actividad amidolítica de las diferentes variantes de la proteína C fue similar. Al aislar la subpoblación de moléculas de proteína C recombinante que contuvieran residuos Gla en todos los residuos Glu precursores, observaron que únicamente el 10% de las moléculas de proteína C portadoras de la mutación Glu16Asp estaban completamente  $\gamma$ -carboxiladas, lo que sugiere que en el dominio Gla deben existir sitios de reconocimiento para la  $\gamma$ -carboxilasa. Dada la gran homología de los dominios Gla de la proteína C y la protrombina, utilizaron la estructura cristalográfica del complejo formado por el dominio Gla de la protrombina y el  $\text{Ca}^{2+}$  para analizar el papel de cada residuo Gla de la proteína C en la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  y en el cambio conformacional que se produce, necesario para la unión a fosfolípidos y para las funciones anticoagulantes de la APC. La interacción entre la proteína C y el  $\text{Ca}^{2+}$  produce un *quenching* de la fluorescencia debido al cambio conformacional que sufre el dominio Gla hacia un entorno más hidrofóbico. Por ello, midieron cambios en la intensidad de la fluorescencia emitida por una serie de soluciones que contenían las diferentes variantes de la proteína C al añadir una solución de  $\text{CaCl}_2$ . Asimismo, estudiaron la unión de 2 anticuerpos anti-proteína C monoclonales cuyos epítopos son creados tras el cambio conformacional del dominio Gla al interactuar con el  $\text{Ca}^{2+}$ . Las diferencias en la fluorescencia emitida por la proteína C portadora de la mutación Glu16Asp comparada con la proteína nativa, y la ausencia de unión de los anticuerpos monoclonales aún en presencia de elevadas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , indican que la conformación del dominio Gla de esta proteína es diferente a la conformación del dominio de la proteína nativa y del resto de variantes. A su vez, analizaron la capacidad de unión de estas variantes mutadas de proteína C a vesículas fosfolípicas, observando que el residuo Gla16 es esencial para adquirir la conformación adecuada del dominio Gla de la proteína, necesaria para la interacción con fosfolípidos. A su vez, concluyeron que la mayor parte de los residuos Gla que coordinan los iones  $\text{Ca}^{2+}$  no expuestos a la superficie y estabilizan su unión a la proteína C, son necesarios para el mantenimiento de la estructura del dominio Gla y para la función anticoagulante de la APC dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$ . Recientemente, Preston y col. (480) han analizado el papel de los residuos Gla en la interacción de la proteína C con el EPCR, con las superficies fosfolípicas y el consiguiente efecto sobre su actividad anticoagulante. Para ello han purificado variantes naturales y preparado variantes recombinantes de proteína C portadoras de mutaciones en aminoácidos que conforman el dominio Gla de la proteína. Han estudiado la capacidad de estas variantes de proteína C para ser activadas sobre la superficie de células endoteliales por el complejo trombina-trombomodulina, para unirse al sEPCR recombinante, y para interactuar con fosfolípidos a través de la inactivación del factor Va. La presencia de la mutación Glu16Asp en el dominio Gla de la proteína C le impide ser activada por el complejo trombina-trombomodulina en presencia de EPCR; impide

la unión de la proteína C al sEPCR; y reduce fuertemente la afinidad de la APC por los fosfolípidos, esencial para la inactivación del factor Va. Estas observaciones sugieren que la mutación Glu16Asp da lugar a un plegamiento incorrecto del dominio Gla que reduce drásticamente estas interacciones impidiendo el correcto funcionamiento de la proteína C. En nuestro estudio describimos la primera variante natural de proteína C portadora de la mutación G1435A que produce un cambio de Glutámico a Lisina en el aminoácido 16 situado en el dominio Gla, esencial para el correcto plegamiento del dominio y funcionamiento de la proteína. Los individuos portadores de esta mutación presentan niveles muy reducidos de APC circulante e historia de TEV, excepto aquellos portadores de corta edad. Postulamos que esta variante de proteína C sufre un plegamiento inadecuado del dominio Gla que le impide ser activada correctamente sobre la superficie celular, en parte, debido a una menor capacidad de interactuar con el EPCR, y no puede desarrollar su función anticoagulante inactivando al factor Va debido a la reducida afinidad de esta variante de APC por las superficies fosfolípicas.

La identificación de esta mutación sugiere que la técnica para la determinación de APC podría ser de utilidad para la detección de deficiencias de proteína C tipo II que sólo pueden ser detectadas mediante ensayos de actividad anticoagulante, los cuales no suelen realizarse en el laboratorio de rutina.

Las mutaciones que no dan lugar a un cambio de aminoácido en la proteína madura (mutaciones silenciosas o sinónimas) no parecen suscitar un gran interés como responsables de una patología. Sin embargo, pueden estar presentes en aquellos individuos, o en los únicos miembros de una familia con historia de TEV que hayan sufrido episodios trombóticos lo cual, en ausencia de cualquier otra mutación, sugeriría una posible asociación entre dicha mutación y la enfermedad. De hecho, se ha demostrado que las diferentes secuencias de codones que codifican para un mismo aminoácido no están presentes al azar en las proteínas, sino que existe una fuerte desviación en favor del uso de codones específicos (481). Esta desviación no parece desaparecer a lo largo del tiempo, lo que sugiere la existencia de una forma de selección indirecta que actúa sobre las mutaciones silenciosas. Se ha sugerido la existencia de un posible efecto modulador de la expresión génica con el uso de determinados codones, puesto que las mutaciones silenciosas alteran la tasa de evolución y, por este mecanismo, facilitarían la aparición de determinados rasgos.

Otro tipo de mutaciones que no parecen mostrar gran relevancia, son aquellas situadas en las regiones intrónicas, las cuales serían funcionales si afectaran a los sitios de splicing, si activaran un sitio de splicing críptico o si crearan un sitio de splicing alternativo que diera lugar a la síntesis de una proteína truncada. Durante el splicing de pre-mRNAs nucleares se produce la interacción de la secuencia consenso en el límite 5´

del intrón (5'-AGgtaagt-3') con las proteínas que componen la maquinaria de splicing o spliceosoma; el reconocimiento de una A (secuencia rama) a ~30 nucleótidos del extremo 3' del intrón por las proteínas del spliceosoma, y la unión a ésta del extremo 5' libre del intrón que se está eliminando; y la interacción de la secuencia consenso en el límite 3' del intrón (5'-cagG-3') con las proteínas del spliceosoma para la escisión total del intrón y la posterior fusión de los exones contiguos (482-484). Además, el procesamiento correcto de los intrones requiere información adicional a la que codifican los sitios de splicing y la secuencia rama. Esta información está distribuida a lo largo del gen, y la aportan elementos *cis* auxiliares como *enhancers* y silenciadores del splicing o elementos reguladores, situados en los intrones y/o exones (485). El triplete GGG es un *enhancer* del splicing que se encuentra en las primeras y últimas 200 bases de los intrones (486, 487).

También existe un grupo de 10 pentámeros, como el motivo CAGGG, que regulan el splicing (488). Von Ashen y col. (460) observaron que la presencia del polimorfismo A19911G en el intrón XIII del gen de la protrombina, cambia la secuencia de CAGAG a CAGGG, creando no sólo un triplete GGG, sino también un motivo pentamérico significativo, lo cual incrementa la eficiencia del splicing. A su vez, se ha descrito la existencia de mutaciones puntales en la proximidad de los límites de splicing del mRNA, que pueden dar lugar a enfermedades genéticas debido a la alteración en la precisión y eficiencia del splicing del mRNA (462, 485). Lind y col. (470) describieron la existencia de una mutación en la proteína C, G2992A, situada en la posición +5 del sitio dador de splicing del intrón IV, la cual causaba una deficiencia tipo II en los individuos portadores, posiblemente como consecuencia del splicing anormal y la reducción en la síntesis de proteína C normal. En el gen de la proteína C se ha descrito un total de 21 mutaciones que modifican el mecanismo de splicing de los intrones, dando lugar a deficiencias de proteína C (251, 357, 464, 489-494).

Las mutaciones situadas en el promotor, pueden crear o eliminar sitios de unión de factores de transcripción, estimular un *enhancer*, o abolir un elemento represor. Asimismo, existen secuencias distales específicas situadas en los intrones o exones, que regulan la transcripción de los genes. Se han descrito mutaciones en los promotores, en las regiones intrónicas correspondientes a elementos reguladores o en las regiones 3' no traducidas, que incrementan la eficiencia de la transcripción y la síntesis de la proteína (328). Además, en el último intrón del gen existen secuencias que pueden influir en la formación de la región 3' del mRNA (318, 495), por lo que mutaciones en estas secuencias podrían alterar la conformación normal del transcrito del gen modificando, a su vez, la síntesis de la proteína.



## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

La especificidad y eficiencia del procesado en 3' están determinadas por la unión de un complejo multiproteico a la secuencia señal (496, 497). La mayor parte de pre-mRNAs contienen 2 secuencias conservadas. La señal de poliadenilación AAUAAA, es reconocida por el factor de especificidad de corte y poliadenilación (CPSF) que determina el sitio de corte a 15 – 20 nucleótidos *downstream*. La segunda secuencia conservada es un elemento rico en residuos U a 10 – 30 nucleótidos del sitio de corte, diana del factor estimulador de corte (CstF) que incrementa la eficiencia del procesado en 3' (498, 499). El sitio de corte suele estar situado inmediatamente detrás de un dinucleótido CA al que se le añade la cola poliA, aunque esta posición no está estrictamente conservada (500-503). Así, la secuencia de la región 3' UT que flanquea el sitio de corte y adición de la cola poliA, regula la expresión de la proteína (460). El gen de la protrombina presenta un mecanismo regulador de la expresión poco convencional, especialmente sensible a las mutaciones que dan lugar a una ganancia de función (504). El nucleótido 20210G en el sitio de corte de la poliadenilación es el nucleótido funcionalmente menos eficiente, pero ha evolucionado para ser fisiológicamente óptimo. De hecho, la presencia del nucleótido 20210A da lugar al incremento del nivel de protrombina en plasma y a un mayor riesgo trombótico (324). Este hecho es compensado por dos elementos reguladores en 3' UTR. *Downstream* del sitio de poliadenilación, existe un sitio de unión débil para el factor estimulador de corte (CstF), que se caracteriza por una baja densidad de residuos U.

La eficiencia del procesado puede incrementarse al introducir residuos U adicionales en esta secuencia diana (505). Así, se ha descrito la mutación C20221T, situada en esta diana de unión del factor CstF que, al añadir un residuo U adicional, incrementa el procesamiento de la región 3' del mRNA y la síntesis de protrombina (506, 507). Estos dos elementos reguladores con baja eficiencia (el sitio de corte y la diana del factor CstF), son compensados por un elemento estimulador rico en residuos U situado dentro de la región 3' UT, *upstream* del sitio de corte, en la misma posición donde se ha observado la presencia de este mismo elemento en otros genes con señales de poliadenilación no convencionales (508-510). La función de este elemento parece ser la de estabilizar el complejo de poliadenilación, al estabilizar la unión del CPSF a la señal de poliadenilación (509, 511, 512). Cabe destacar que parte de esta región reguladora en 3' UTR no está presente en el mRNA transcrito (506, 507), por lo que su efecto no puede ser el de un *enhancer* convencional. La terminación de la traducción está perfectamente definida por un codón de parada, pero no existe una señal tan clara para la terminación de la elongación de la transcripción por la RNAPol II. Estudios *in vitro* de transfección del gen humano de la  $\beta$ -globina, mostraron que la transcripción termina en una región de 1,5 kb posterior al sitio poliA (513). Se demostró que la

transcripción más allá de la región donde normalmente termina, depende de la presencia de un sitio poliA funcional y de un aceptor de splicing terminal.

Estos datos indican la existencia de una precisa interacción entre splicing, poliadenilación y la terminación de la transcripción (496, 514, 515). Además, la presencia de mutaciones en la región 3' UT de un gen pueden modificar (crear o eliminar) el sitio de unión de un factor de transcripción, lo cual puede dar lugar a un incremento en la estabilidad del mRNA transcrito y una mayor tasa de expresión o, por el contrario, puede resultar en una desestabilización del mRNA que de lugar a su eliminación y una menor síntesis proteica. Navarro y col. (516) han descrito que el RNA de la trombomodulina es desestabilizado por el interferón- $\gamma$  a través de un elemento situado en su región 3' no traducida. Al incubar las células con interferón- $\gamma$ , éste se une a su receptor en la superficie celular e induce la fosforilación del factor de transcripción Stat1, el cual es translocado al núcleo donde se une a secuencias *enhancer* presentes en los genes estimulados por el interferón- $\gamma$ . A su vez, el interferón- $\gamma$  puede modificar la concentración de algunos RNAs mediante mecanismos post-transcripcionales, como es el caso del RNA de la trombomodulina. El transcrito de la trombomodulina contiene una gran región 3' no traducida con varios elementos ricos en AU (AREs), los cuales están implicados en la regulación del descenso del nivel de mRNA. Así, al incubar las células con interferón- $\gamma$  se acelera el descenso de los niveles de mRNA de la trombomodulina mediante una desestabilización post-transcripcional a través de su región 3' UT. En definitiva, pueden existir mutaciones en la región 3' UT del mRNA que modifiquen la cantidad de pre-mRNA, que modifiquen el sitio de corte en 3', que modifiquen la longitud de la cola poliA estabilizando el mRNA maduro, o que incrementen la eficiencia de reconocimiento de la señal de corte en 3' afectando a la eficiencia de la traducción del mRNA (328, 330, 460, 504, 516-530).

En conclusión, los polimorfismos identificados en nuestro estudio que, aparentemente, presentan una mayor relevancia se encuentran en el gen del EPCR. La mayor parte de los polimorfismos identificados en el gen de la protrombina y de la proteína C, se localizan en regiones no codificantes, no dan lugar a un cambio de aminoácido, o no mostraron diferencias significativas en las frecuencias de los grupos de pacientes y controles. Por ello, nos dispusimos a estudiar con mayor profundidad los polimorfismos identificados en el gen del EPCR, analizando su posible asociación con los niveles de APC y con el riesgo trombótico, y analizando el efecto sobre otras mutaciones de riesgo trombótico. Además, durante el transcurso de esta tesis surgió un ELISA para medir los niveles de sEPCR, por lo que comprobamos la posible asociación de estos polimorfismos con los niveles del receptor soluble.

La trombofilia es una enfermedad oligogénica, en la que la combinación de factores de riesgo genéticos daría lugar a interacciones epistáticas (531). De hecho, se ha demostrado la existencia de interacciones epistáticas entre la mutación factor V Leiden y mutaciones en el gen de la proteína C (253), proteína S (531), y el polimorfismo G20210A de la protrombina (532). Estudios realizados en familias seleccionadas con TEV indicaron que la presencia de mutaciones en dos genes incrementaría la penetrancia de la enfermedad trombótica (253, 265). Más concretamente, en individuos con una deficiencia heterocigota de proteína C, generalmente se requiere la presencia simultánea de un segundo defecto para provocar el episodio trombótico (253, 531). Por ello, resultaría también de especial interés analizar si las mutaciones identificadas en nuestro estudio alteran el riesgo de trombosis que conlleva la presencia de otras mutaciones bien caracterizadas, como el análisis de la interacción entre los polimorfismos identificados en el EPCR y la presencia de la mutación factor V Leiden.

#### **5.4 ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL EPCR A LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE EPCR SOLUBLE Y DE APC CIRCULANTE, Y AL RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA**

El estudio de los polimorfismos A4600G y G4678C del gen del EPCR en 401 individuos sanos y en 405 pacientes con una historia de TEV demostró que el polimorfismo A4600G está asociado con la variación en los niveles de EPCR soluble, sEPCR, en plasma, pero no con un aumento del riesgo de TEV, mientras que el polimorfismo G4678C está asociado a la variación en los niveles de APC circulante y tiene un efecto protector frente al TEV.

La existencia de alteraciones en el mecanismo de activación de la proteína C a causa del EPCR, daría lugar a situaciones potencialmente trombogénicas. Estas alteraciones podrían ser debidas a una pérdida de función como resultado de mutaciones en el gen del EPCR que dieran lugar a una menor expresión del receptor en la membrana de la célula endotelial. Se ha descrito la existencia de una inserción de 23 pb en el gen del EPCR que da lugar a la síntesis de una forma truncada de la proteína incapaz de anclarse a la membrana y, por lo tanto, no funcional (449). A pesar de la existencia de diferentes estudios poblacionales, la asociación de esta mutación con el riesgo de trombosis venosa o arterial no ha podido ser establecida a causa de la baja frecuencia alélica de la misma (409, 411, 413, 441-450). Asimismo, se han descrito

mutaciones puntuales en la región promotora del gen del EPCR en 4 pacientes con TEV (410), aunque no se ha podido establecer claramente el papel de las mismas en la regulación del gen. Otro posible mecanismo responsable de una disfunción en el sistema de la proteína C, sería la presencia de mutaciones en el gen del EPCR que dieran lugar al aumento de los niveles de sEPCR. De hecho, un nivel elevado de sEPCR en plasma podría generar un estado pretrombótico, puesto que se ha descrito que la fracción soluble del EPCR puede inhibir tanto la activación de la proteína C como la actividad de la APC, al competir por la unión a la proteína C con el EPCR anclado a la membrana endotelial.

Recientemente, dos estudios han descrito la distribución bimodal de los niveles de sEPCR en la población sana (420, 533). Así, el 80% de los individuos presentan niveles de sEPCR entre 75 y 175 ng/ml, mientras que el 20% restante presentan niveles entre 175 y 700 ng/ml. Esta distribución bimodal parece ser persistente en las poblaciones francesa e italiana, lo que sugiere una posible determinación genética de los mismos. Así, sería de especial interés comprobar la existencia de una distribución bimodal de los niveles de sEPCR en nuestra población sana, investigar la posible existencia de una regulación genética y, en caso de encontrar un componente genético determinante de los mismos, investigar su asociación con el incremento del riesgo de TEV.

Así, en nuestro estudio, quisimos analizar el posible efecto de la presencia de las dos mutaciones identificadas por nosotros en el gen del EPCR, A4600G y G4678C, sobre los niveles de sEPCR y de APC circulante y analizar su efecto sobre el riesgo de TEV. Nuestros resultados demuestran que los niveles de sEPCR están asociados al polimorfismo A4600G en el gen del EPCR. El haplotipo caracterizado por el alelo 4600G está fuertemente asociado a los niveles plasmáticos de sEPCR. Este polimorfismo predice un cambio de Serina a Glicina en el aminoácido en posición 219 de la proteína, situado en la región transmembrana del receptor, y nuestros resultados indican que el haplotipo que codifica para la isoforma 219Gly está asociado a niveles elevados de sEPCR en plasma. La presencia del polimorfismo G4678C no parece ejercer ningún efecto sobre los niveles de sEPCR. Estos resultados están en concordancia con aquellos descritos por Saposnik y col. (411), quienes han descrito la presencia de 3 haplotipos en el gen del EPCR, A1, A2 y A3, en los que A1 corresponde a la combinación de alelos 4600A/4678C, el haplotipo A2 corresponde a la combinación de alelos 4600A/4678G, y el haplotipo A3 corresponde a la combinación de alelos 4600G/4678G. Igualmente, han observado que el haplotipo A3 está asociado a niveles aumentados de sEPCR. Recientemente, Uitte de Willige y col. (412) han descrito la existencia de un cuarto haplotipo en el gen del EPCR, caracterizado por dos nuevos polimorfismos (T2078C y G3811A). De igual forma, han observado una

asociación entre los niveles de sEPCR y el polimorfismo A4600G y que la presencia del polimorfismo G4678C no modifica estos niveles.

La distribución de los niveles plasmáticos de sEPCR en la población sana es bimodal (420), lo cual hemos podido comprobar en nuestro estudio (ver *Figura 4.14* en Resultados), aunque se ha sugerido la existencia de una distribución trimodal de los mismos debido a la presencia de individuos sanos de genotipo 4600GG en dicho estudio, los cuales presentan niveles de sEPCR todavía más elevados (412). Se desconoce el mecanismo por el que un porcentaje significativo de individuos sanos (aproximadamente el 18% en nuestra población) presenta niveles elevados de sEPCR en plasma. Podría ser debido a la existencia de un estado hipercoagulable, puesto que se ha descrito que los niveles de sEPCR disminuyen tras la administración de warfarina (420). De hecho, observamos que los individuos con niveles de sEPCR iguales o superiores al punto de corte 175 ng/ml presentaban niveles de F1+2 significativamente más elevados que aquellos individuos con niveles de sEPCR por debajo de 175 ng/ml ( $p = 0,0003$ ). Puesto que el nivel de F1+2 es un marcador de la generación de trombina, estos datos podrían indicar que los niveles aumentados de sEPCR en individuos sanos reflejan un mayor nivel de generación de trombina, como ha sido sugerido previamente (420).

Sin embargo, nuestros datos y los datos de Saposnik y col. y Uitte de Willige y col. demuestran que existe, a su vez, una importante influencia genética sobre los niveles de sEPCR en plasma. La gran mayoría (88%) de individuos con niveles de sEPCR iguales o superiores a 175 ng/ml eran portadores del genotipo 4600AG. De hecho, observamos que el polimorfismo A4600G explica el 56% de la varianza total de los niveles de sEPCR en el grupo control, siendo el principal factor determinante de los niveles de sEPCR en nuestra población sana. Por tanto, es posible que la isoforma 219Gly del EPCR genere un receptor anclado a la membrana endotelial más susceptible a ser escindido por las metaloproteasas. Cabe destacar que el aminoácido Gly219 está próximo a otro residuo Gly, por lo que la existencia de dos residuos Gly adyacentes podrían desestabilizar el dominio helicoidal transmembrana modificando la exposición del sitio de corte e incrementando la susceptibilidad de la proteína al ataque de las metaloproteasas. Además, resulta de especial interés el hecho de que el aminoácido 219 está muy próximo al presunto sitio de corte de la metaloproteasa. Una mayor generación de trombina podría dar lugar a una mayor tasa de liberación de EPCR de la membrana, como sugiere la correlación positiva entre los niveles de sEPCR y los niveles de F1+2; pero, a su vez, frente a un mismo nivel de producción de trombina endógena, los individuos con la isoforma 219Gly podrían presentar una mayor tasa de generación de sEPCR. Por otro lado, cabe la posibilidad de que este incremento en los niveles de sEPCR asociados al haplotipo A3, fuera debido a que uno o varios de los nucleótidos

que caracterizan a este haplotipo (-685G, 1274C, 1880A y 4600G) estabilizaran el mRNA generado por el alelo A3, dando lugar a una mayor síntesis proteica.

Asimismo, hemos observado que el alelo 4678C (haplotipo A1) en el gen del EPCR está asociado a niveles de APC circulante ligeramente aumentados. Se desconoce el mecanismo por el cual este haplotipo podría inducir un incremento en los niveles de APC circulante. En estudios previos, demostramos que los niveles de APC circulante son proporcionales a la concentración de proteína C (365, 366). Puesto que los individuos portadores del genotipo 4678CC presentaban un nivel medio de proteína C ( $99\% \pm 16\%$ ) similar a aquellos con genotipo GG ( $103\% \pm 19\%$ ) y a aquellos con genotipo GC ( $104\% \pm 19\%$ ), podemos descartar que el incremento en los niveles de APC sea debido a un incremento en los niveles de proteína C. Por otro lado, la activación de la proteína C parece ser proporcional a la concentración de EPCR sobre la superficie de la célula endotelial (66). Por tanto, el aumento en los niveles de APC circulante observado podría ser explicado por un incremento en la expresión del EPCR asociada al alelo 4678C. En la actualidad desconocemos si el alelo 4678C, por él mismo, es capaz de inducir el incremento en los niveles de APC o si este incremento está asociado con algún otro polimorfismo funcional situado en el mismo haplotipo del gen del EPCR. Puesto que la trombina sería el principal factor determinante de los niveles de APC, la existencia de alteraciones en la concentración de F1+2 podría explicar algunas de las variaciones en los niveles de APC circulante. De hecho, observamos un incremento en los niveles de F1+2 de forma paralela al incremento en el número de alelos 4678C, aunque únicamente ocurre en los individuos portadores del genotipo 4600AA (ver *Tabla 4.10* en Resultados). De manera global, la correlación entre los niveles de APC circulante y de F1+2 en individuos sanos es bastante débil, aunque significativa.

Los dos polimorfismos descritos en este estudio son marcadores de diferentes haplotipos, y ambos haplotipos parecen ser funcionales, afectando a los niveles de sEPCR y de APC circulante en individuos sanos, hecho que nos condujo a estudiar el efecto de estos dos polimorfismos sobre el riesgo de TEV. La frecuencia del alelo 4600G (haplotipo A3) era prácticamente igual en pacientes que en controles, lo que sugiere que el alelo G no incrementa el riesgo de TEV. Estos resultados están en concordancia con datos descritos previamente (412, 421, 446), pero contradicen los resultados descritos por Saposnik y col. (411) quienes observaron que el haplotipo A3 estaba representado en mayor proporción en el grupo de pacientes, dando lugar a un OR de 1,8 ( $p = 0,004$ ). No hemos encontrado una firme explicación para esta discrepancia. La frecuencia del haplotipo A3 en el grupo control era idéntica en sendos estudios: 0,092. Por tanto, la causa de esta discrepancia debe ser las diferencias en la distribución de los haplotipos entre ambos grupos de pacientes (0,138 y 0,094 respectivamente).

Saposnik y col. sugieren que el mecanismo que asocia al haplotipo A3 con un mayor riesgo de TEV puede implicar a los niveles aumentados de sEPCR asociados con este haplotipo, los cuales disminuirían la generación de APC y, a su vez, inhibirían a la APC generada. Sin embargo, no podrían explicar el hecho de que solamente observaran un aumento del riesgo de trombosis en hombres, mientras que los niveles de sEPCR estaban incrementados tanto en hombres como en mujeres portadoras del haplotipo A3. En nuestro estudio, los pacientes y controles mostraron niveles similares de sEPCR, y la distribución de haplotipos en los grupos de hombres y mujeres fue similar. Como hemos descrito anteriormente, los niveles plasmáticos de sEPCR no están asociados con un mayor riesgo de TEV en nuestro estudio y, puesto que los niveles de sEPCR están asociados con el haplotipo A3, este podría ser el motivo por el que no se ha observado una asociación entre el haplotipo A3 y un mayor riesgo trombótico.

Nuestros resultados indican que el alelo 4678C (haplotipo A1), y especialmente los portadores del genotipo CC (homocigotos A1A1), presentan un riesgo de TEV reducido (ver *Tabla 4.11* en Resultados). Una posible explicación para esta observación sería que el haplotipo A1 esté asociado a una mayor expresión de EPCR, lo cual podría explicar el aumento en los niveles de APC asociado a este genotipo, tanto en pacientes como en controles. Concretamente, hemos descrito previamente que niveles reducidos de APC están asociados a un aumento en el riesgo de TEV (366). A diferencia de nuestros resultados, Galligan y col. (453) observaron una frecuencia similar del alelo 4678C en pacientes con trombosis venosa y en individuos sanos. El hecho de que la frecuencia genotípica en nuestro grupo control sea muy similar a la frecuencia observada en sus controles, de nuevo parece indicar que la discrepancia aparente entre sus resultados y los nuestros es causada por diferencias en la distribución genotípica entre los grupos de pacientes. El haplotipo A3 es el menos frecuente de los tres haplotipos del EPCR. Desde un punto de vista evolutivo, el hecho de que el haplotipo A3 únicamente difiera del haplotipo A2 en 4 nucleótidos indica que este alelo es el más joven de los 3. Este hecho podría explicar las diferencias en las distribuciones alélicas observadas en función del origen étnico de la población estudiada. Es probable que el alelo A3 se encuentre fundamentalmente en individuos blancos. De hecho, Hayashi y col. (291) no encontraron el alelo 4600G en la población japonesa.

En conclusión, nuestros resultados confirman que los polimorfismos A4600G y G4678C en el gen del EPCR definen 3 haplotipos. El haplotipo definido por el alelo 4600G (A3) está asociado con niveles de sEPCR incrementados pero no modifica el riesgo de TEV, mientras que el genotipo 4678CC (homocigoto A1A1) está asociado con niveles aumentados de APC circulante y disminución del riesgo de TEV.

5.5 **ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL EPCR AL RIESGO DE TROMBOSIS VENOSA EN INDIVIDUOS PORTADORES DE LA MUTACIÓN FACTOR V LEIDEN**

Tras analizar el efecto de los dos polimorfismos identificados en el gen del EPCR sobre el riesgo de TEV, observamos que el polimorfismo A4600G no parece estar asociado con el riesgo de TEV, mientras que la presencia del genotipo 4678CC parece inducir un aumento en los niveles de APC circulante y la disminución del riesgo de TEV. Estas observaciones nos llevaron a profundizar sobre el posible papel de estos polimorfismos en el riesgo de TEV, analizando si su presencia modifica el riesgo de TEV ya aumentado que presentan los individuos portadores de la mutación factor V Leiden.

Nuestros resultados demuestran que el alelo 4678C y el genotipo 4678CC están representados en menor proporción en los individuos portadores de la mutación factor V Leiden con historia de TEV que en los portadores asintomáticos. Su presencia reduce aproximadamente 2 veces el riesgo de TEV en individuos portadores de la mutación factor V Leiden. Puesto que únicamente disponíamos de muestras de sangre anticoagulada con EDTA de estos individuos, no pudimos llevar a cabo la determinación de los niveles de APC circulante de los mismos. Sin embargo, estudios previos muestran que el alelo 4678C y el genotipo 4678CC están asociados con un aumento de la concentración de APC en plasma (421, 427). En el presente estudio, observamos que el 13,2% de los individuos portadores de la mutación factor V Leiden sintomáticos y el 24,6% de los portadores asintomáticos presentaban el genotipo 4678CC, datos que están en concordancia con los resultados observados en un estudio previo que mostró que el 14,3% de los pacientes con TEV y el 22,2% de los controles eran portadores del genotipo 4678CC (427), y que tanto los pacientes como los controles portadores del genotipo CC presentaban niveles de APC significativamente más elevados que los portadores de los genotipos GG o GC. Petäjä y col. (534) mostraron que los individuos portadores de la mutación factor V Leiden en heterocigosis presentaban niveles de APC similares o ligeramente más elevados que los individuos sanos no portadores de la mutación. Así, el conjunto de estos datos sugiere que el efecto protector asociado al alelo 4678C en portadores de la mutación factor V Leiden podría estar relacionado con el aumento en los niveles de APC en plasma observados previamente en pacientes con TEV y en individuos sanos portadores del genotipo 4678CC.



Nuestros resultados muestran que el polimorfismo A4600G no modifica el riesgo de TEV en portadores de la mutación factor V Leiden. La frecuencia del alelo 4600G y del genotipo 4600AG fue similar en portadores sintomáticos y asintomáticos. Estos datos están en concordancia con nuestros estudios previos que muestran que el polimorfismo A4600G no modifica el riesgo de TEV (427).

La asociación del polimorfismo G4678C y el riesgo de TEV podría explicarse a través de diferentes mecanismos. La proteína C es un zimógeno que precisa ser activado para ejercer su función anticoagulante. Esta activación parece ser proporcional a la concentración de EPCR en la membrana de la célula endotelial (66). Por tanto, un incremento en la expresión del EPCR asociado al genotipo 4678CC podría explicar el aumento de los niveles de APC en plasma. Actualmente no sabemos si el alelo 4678C, por él mismo, induce el aumento en los niveles de APC o si este incremento está asociado con alguna otra mutación funcional presente en el mismo haplotipo del gen del EPCR. Sapoznik y col. (411) han identificado 13 polimorfismos en completo desequilibrio de ligamiento en el gen del EPCR, entre ellos el A4600G y el G4678C, cuya combinación de alelos define 3 haplotipos distintos. Generalmente, los sitios de unión funcionales para factores de transcripción están situados en la región promotora de los genes; sin embargo, existen ejemplos de la presencia de sitios de unión funcionales en la región 3' UT del gen (328, 504-507, 516-519, 535). Alternativamente, la presencia del alelo 4678C podría modificar algún sitio de unión para un factor de transcripción que indujera un aumento en la estabilidad del mRNA y, en consecuencia, una mayor expresión de la proteína (536).

El TEV es una enfermedad multifactorial (424, 537). De hecho, gran parte de los pacientes con historia de TEV presentan más de un factor de riesgo genético y/o ambiental. Asimismo, existe una firme evidencia de que el riesgo de TEV aumenta en proporción al número de factores de riesgo que predisponen a un individuo (538-540). Sin embargo, la presencia de otras mutaciones en las rutas anticoagulantes podría inducir una ganancia de función y, por tanto, conllevar una reducción del riesgo de TEV. Nuestros resultados, combinados con aquellos que muestran la asociación entre el alelo 4678C y los niveles aumentados de APC en plasma (421, 427), sugieren que el alelo 4678C o alguna otra mutación en completo desequilibrio de ligamiento con él, podría ejercer un papel antitrombótico compensatorio induciendo una ganancia de función, al aumentar la síntesis de EPCR y, por tanto, la activación de la proteína C. El resultado final de este aumento de los niveles de APC en plasma, sería una disminución del riesgo de TEV.

En conclusión, nuestros resultados muestran que el alelo 4678C en el gen del EPCR confiere un efecto protector frente al TEV. Los individuos portadores de la mutación factor V Leiden con genotipo 4678CC presentan un riesgo de TEV 2,2 veces menor que los individuos con genotipo GG o GC, lo cual podría deberse a los niveles de APC más elevados observados previamente en individuos portadores del genotipo 4678CC.



## **6. CONCLUSIONES**



1. - Hemos desarrollado un ensayo para la cuantificación de los niveles circulantes de proteína C activada que es rápido, fácil de llevar a cabo y con un límite de detección suficientemente bajo como para detectar niveles muy reducidos de APC circulante posiblemente presentes en algunas patologías trombóticas.
2. - Un nivel reducido de proteína C activada es un riesgo prevalente e independiente de tromboembolismo venoso. Individuos con un nivel de proteína C activada inferior al percentil 10% del grupo control tienen entre 4 y 5 veces más riesgo de tromboembolismo venoso que aquellos con niveles por encima de dicho percentil.
3. - En algunos casos, este bajo nivel de proteína C activada parece estar genéticamente determinado.
4. - La determinación de la proteína C activada nos ha permitido seleccionar pacientes con tromboembolismo venoso y con niveles de proteína C activada persistentemente bajos. En estos pacientes, hemos detectado un número considerable de mutaciones en los cuatro genes que codifican para las proteínas implicadas en la activación de la proteína C.
5. - Al menos dos de los polimorfismos encontrados parecen ser funcionales.
6. - El polimorfismo G4678C en el gen del receptor endotelial de la proteína C está asociado con una variación en los niveles de APC circulante. Los portadores del genotipo 4678CC presentan un nivel medio de proteína C activada más elevado y un menor riesgo de tromboembolismo venoso que los de genotipo GG o GC.
7. - El polimorfismo C1418T en el gen de la trombomodulina también está asociado con una variación en los niveles de APC circulante. Los portadores del genotipo 1418TT presentan mayores niveles de proteína C activada y un menor riesgo de tromboembolismo venoso.

## **Mutaciones en el Sistema de la proteína C \_\_\_\_\_**

8. - El riesgo de tromboembolismo venoso en portadores de la mutación factor V Leiden está disminuido en aquellos individuos que, a su vez, son portadores del genotipo 4678CC en el gen del receptor endotelial de la proteína C, comparado con los de genotipo GG o GC. Además, en familias portadoras de factor V Leiden, los miembros con genotipo 4678CC mostraron menor probabilidad de sufrir un episodio trombótico, y entre los individuos con historia de trombosis, ésta tuvo lugar a una edad más avanzada en aquellos con genotipo 4678CC.
  
9. - Nuestros resultados resaltan la importancia que las alteraciones del sistema de la proteína C tienen en el riesgo de tromboembolismo venoso. Las numerosas funciones de la proteína C activada sugieren la creación de nuevas líneas de estudio que permitan esclarecer el efecto de estas alteraciones sobre el equilibrio hemostático.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**





1. Sage H. Characterization and modulation of extracellular glycoproteins secreted by endothelial cells in culture. In: Gimbrone MA, ed. *Vascular Endothelium in Hemostasis and Thrombosis*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1986:187-208.
2. Del Vecchio PJ, Siflinger-Birnboim A, Shepard JM, Bizios R, Cooper JA, Malik AB. Endothelial monolayer permeability to macromolecules. *Fed Proc* 1987; **46**: 2511-5.
3. Mannuci PM, Tripodi A. Mechanisms, markers and management of hypercoagulable states. *Haemostasis* 1996; **26 (Suppl 4)**: 1-8.
4. Ware AG, Seegers WH. Two stage procedure for the quantitative determination of prothrombin concentration. *Am J Clin Pathol* 1949; **19**: 471-82.
5. Seegers WH. Activation of purified prothrombin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949; **72**: 677-80.
6. Öhlin AK, Stenflo J. Some structure-function relationships in protein C. In: Aznar J, España F, eds. *Protein C pathway*. Vol. **11-24**. Barcelona: Springer-Verlag; 1991
7. Stenflo J, Suttie JW. Vitamin K-dependent formation of gamma-carboxyglutamic acid. *Annu Rev Biochem* 1977; **46**: 157-72.
8. Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood* 1990; **76**: 1-16.
9. Spek CA, Reitsma PH. Genetic risk factors for venous thrombosis. *Mol Genet Metab* 2000; **71**: 51-61.
10. Mann KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 165-74.
11. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandy M, Dahlbäck B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 1996; **76**: 651-62.
12. Rapaport SI, Rao LV. The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thromb Haemost* 1995; **74**: 7-17.
13. Ruf W, Edgington TS. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *Faseb J* 1994; **8**: 385-90.
14. Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 66-74.
15. Henschen A, McDonagh J. Fibrinogen, fibrin and factor XIII. In: Zwaal RFA, Hemker HC, eds. *Blood Coagulation*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division); 1986:171-239.

16. Davie EW. Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thromb Haemost* 1995; **74**: 1-6.
17. Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG. The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. *J Biol Chem* 1979; **254**: 10952-62.
18. Reddy KS. Cardiovascular disease in non-Western countries. *N Engl J Med* 2004; **350**: 2438-40.
19. Carrell RW, Pemberton PA, Boswell DR. The serpins: evolution and adaptation in a family of protease inhibitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1987; **52**: 527-35.
20. Carrell RW. Coagulation, anticoagulation and thrombosis: molecular mechanisms. *Haematologica* 2004; **89 (Suppl 1)**: 100-4.
21. Abilgaard U. Binding of thrombin to antithrombin III. *Scand J Clin Lab Invest* 1969; **24**: 23-27.
22. Lawrence DA. The serpin-proteinase complex revealed. *Nat Struct Biol* 1997; **4**: 339-41.
23. Olson ST, Björk I. Role of protein conformational changes, surface approximation and protein cofactors in heparin-accelerated antithrombin-proteinase reactions. *Adv Exp Med Biol* 1992; **313**: 155-65.
24. Olson ST, Björk I, Sheffer R, Craig PA, Shore JD, Choay J. Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement. *J Biol Chem* 1992; **267**: 12528-38.
25. van Boeckel CA, Grootenhuis PD, Visser A. A mechanism for heparin-induced potentiation of antithrombin III. *Nat Struct Biol* 1994; **1**: 423-5.
26. Choay J, Petitou M, Lormeau JC, Sinay P, Casu B, Gatti G. Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; **116**: 492-9.
27. Lindahl U, Thunberg L, Backstrom G, Riesenfeld J, Nordling K, Björk I. Extension and structural variability of the antithrombin-binding sequence in heparin. *J Biol Chem* 1984; **259**: 12368-76.
28. Olson ST, Björk I. Predominant contribution of surface approximation to the mechanism of heparin acceleration of the antithrombin-thrombin reaction. Elucidation from salt concentration effects. *J Biol Chem* 1991; **266**: 6353-64.
29. Koster T, Rosendaal FR, Briët E, van der Meer FJ, Colly LP, Trienekens PH, Poort SR, Reitsma PH, Vandenbroucke JP. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood* 1995; **85**: 2756-61.

30. Tait RC, Walker ID, Islam SI, McCall F, Conkie JA, Mitchell R, Davidson JF. Influence of demographic factors on antithrombin III activity in a healthy population. *Br J Haematol* 1993; **84**: 476-80.
31. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, Chandy M, Dahlbäck B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited thrombophilia: Part 2. *Thromb Haemost* 1996; **76**: 824-34.
32. Thaler E, Lechner K. Antithrombin III deficiency and thromboembolism. *Clin Haematol* 1981; **10**: 369-90.
33. Hirsh J, Piovella F, Pini M. Congenital antithrombin III deficiency. Incidence and clinical features. *Am J Med* 1989; **87**: 34S-38S.
34. Corral J, Huntington JA, González-Conejero R, Mushunje A, Navarro M, Marco P, Vicente V, Carrell RW. 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.
35. Tollefsen DM. Insight into the mechanism of action of heparin cofactor II. *Thromb Haemost* 1995; **74**: 1209-14.
36. Villa P, Aznar J, Vayá A, España F, Ferrando F, Mira Y, Estellés A. Hereditary homozygous heparin cofactor II deficiency and the risk of developing venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 1011-4.
37. Corral J, Aznar J, González-Conejero R, Villa P, Minano A, Vayá A, Carrell RW, Huntington JA, Vicente V. 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.
38. Broze GJ, Jr., Girard TJ, Novotny WF. Lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Curr Stud Hematol Blood Transfus* 1991: 22-5.
39. Broze GJ, Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995; **74**: 90-3.
40. Sandset PM, Bendz B. Tissue factor pathway inhibitor: clinical deficiency states. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 467-70.
41. Dahm A, Van Hylckama Vlieg A, Bendz B, Rosendaal F, Bertina RM, Sandset PM. Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 2003; **101**: 4387-92.
42. Llobet D, Falkon L, Mateo J, Vallve C, Martinez E, Fontcuberta J, Borrell M. Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in two out of three members of a family with thrombophilia. *Thromb Res* 1995; **80**: 413-8.
43. Varadi K, Philapitsch A, Santa T, Schwarz HP. Activation and inactivation of human protein C by plasmin. *Thromb Haemost* 1994; **71**: 615-21.
44. Shen L, Dahlbäck B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem* 1994; **269**: 18735-8.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

45. Esmon CT. Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1477**: 349-60.
46. Kisiel W. Human plasma protein C: isolation, characterization, and mechanism of activation by alpha-thrombin. *J Clin Invest* 1979; **64**: 761-9.
47. Esmon NL, DeBault LE, Esmon CT. Proteolytic formation and properties of gamma-carboxyglutamic acid-domainless protein C. *J Biol Chem* 1983; **258**: 5548-53.
48. Amphlett GW, Kisiel W, Castellino FJ. Interaction of calcium with bovine plasma protein C. *Biochemistry* 1981; **20**: 2156-61.
49. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 10212-6.
50. Fukudome K, Ye X, Tsuneyoshi N, Tokunaga O, Sugawara K, Mizokami H, Kimoto M. Activation mechanism of anticoagulant protein C in large blood vessels involving the endothelial cell protein C receptor. *J Exp Med* 1998; **187**: 1029-35.
51. Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 26486-91.
52. Xu J, Qu D, Esmon NL, Esmon CT. Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem* 2000; **275**: 6038-44.
53. Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Carson CW, D'Angelo A, Della Valle P, Esmon CT. Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. *Blood* 1998; **91**: 725-7.
54. Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica J, Fukudome K, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. Inhibition of activated protein C anticoagulant function without modulation of reaction with proteinase inhibitors. *J Biol Chem* 1996; **271**: 17499-503.
55. Liaw PC, Neuenschwander PF, Smirnov MD, Esmon CT. Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *J Biol Chem* 2000; **275**: 5447-52.
56. Stern DM, Nawroth PP, Harris K, Esmon CT. Cultured bovine aortic endothelial cells promote activated protein C-protein S-mediated inactivation of factor Va. *J Biol Chem* 1986; **261**: 713-8.
57. Tans G, Rosing J, Thomassen MC, Heeb MJ, Zwaal RF, Griffin JH. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. *Blood* 1991; **77**: 2641-8.

58. Maruyama I, Majerus PW. The turnover of thrombin-thrombomodulin complex in cultured human umbilical vein endothelial cells and A549 lung cancer cells. Endocytosis and degradation of thrombin. *J Biol Chem* 1985; **260**: 15432-8.
59. Ishii H, Salem HH, Bell CE, Laposata EA, Majerus PW. Thrombomodulin, an endothelial anticoagulant protein, is absent from the human brain. *Blood* 1986; **67**: 362-5.
60. Busch C, Cancilla PA, DeBault LE, Goldsmith JC, Owen WG. Use of endothelium cultured on microcarriers as a model for the microcirculation. *Lab Invest* 1982; **47**: 498-504.
61. Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989; **264**: 4743-6.
62. Olsen PH, Esmon NL, Esmon CT, Laue TM. Ca<sup>2+</sup> dependence of the interactions between protein C, thrombin, and the elastase fragment of thrombomodulin. Analysis by ultracentrifugation. *Biochemistry* 1992; **31**: 746-54.
63. Esmon CT. Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation. *Crit Care Med* 2001; **29**: S48-51; discussion 51-2.
64. Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; **78**: 2249-52.
65. Laszik Z, Mitro A, Taylor FB, Jr., Ferrell G, Esmon CT. Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* 1997; **96**: 3633-40.
66. Xu J, Esmon NL, Esmon CT. Reconstitution of the human endothelial cell protein C receptor with thrombomodulin in phosphatidylcholine vesicles enhances protein C activation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 6704-10.
67. Taylor FB, Jr., Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood* 2001; **97**: 1685-8.
68. Healy AM, Rayburn HB, Rosenberg RD, Weiler H. Absence of the blood-clotting regulator thrombomodulin causes embryonic lethality in mice before development of a functional cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 850-4.
69. Gu JM, Crawley JT, Ferrell G, Zhang F, Li W, Esmon NL, Esmon CT. Disruption of the endothelial cell protein C receptor gene in mice causes placental thrombosis and early embryonic lethality. *J Biol Chem* 2002; **277**: 43335-43.
70. Walker FJ. Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. *J Biol Chem* 1980; **255**: 5521-4.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

71. Kisiel W, Canfield WM, Ericsson LH, Davie EW. Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. *Biochemistry* 1977; **16**: 5824-31.
72. Fulcher CA, Gardiner JE, Griffin JH, Zimmerman TS. Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V. *Blood* 1984; **63**: 486-9.
73. Smirnov MD, Safa O, Regan L, Mather T, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Rezaie AR, Esmon NL, Esmon CT. A chimeric protein C containing the prothrombin Gla domain exhibits increased anticoagulant activity and altered phospholipid specificity. *J Biol Chem* 1998; **273**: 9031-40.
74. Nesheim ME, Canfield WM, Kisiel W, Mann KG. Studies of the capacity of factor Xa to protect factor Va from inactivation by activated protein C. *J Biol Chem* 1982; **257**: 1443-7.
75. Suzuki K, Stenflo J, Dahlbäck B, Teodorsson B. Inactivation of human coagulation factor V by activated protein C. *J Biol Chem* 1983; **258**: 1914-20.
76. Solymoss S, Tucker MM, Tracy PB. Kinetics of inactivation of membrane-bound factor Va by activated protein C. Protein S modulates factor Xa protection. *J Biol Chem* 1988; **263**: 14884-90.
77. Bertina RM, Cupers R, van Wijngaarden A. Factor IXa protects activated factor VIII against inactivation by activated protein C. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **125**: 177-83.
78. Walker FJ, Chavin SI, Fay PJ. Inactivation of factor VIII by activated protein C and protein S. *Arch Biochem Biophys* 1987; **252**: 322-8.
79. Rick ME, Esmon NL, Krizek DM. Factor IXa and von Willebrand factor modify the inactivation of factor VIII by activated protein C. *J Lab Clin Med* 1990; **115**: 415-21.
80. Odegaard B, Mann K. Proteolysis of factor Va by factor Xa and activated protein C. *J Biol Chem* 1987; **262**: 11233-8.
81. Kane WH, Davie EW. Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood* 1988; **71**: 539-55.
82. Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem* 1993; **268**: 2872-7.
83. Fay PJ, Smudzyn TM, Walker FJ. Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa. Identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. *J Biol Chem* 1991; **266**: 20139-45.

84. Lamphear BJ, Fay PJ. Proteolytic interactions of factor IXa with human factor VIII and factor VIIIa. *Blood* 1992; **80**: 3120-6.
85. Eaton D, Rodríguez H, Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* 1986; **25**: 505-12.
86. Regan LM, Lamphear BJ, Huggins CF, Walker FJ, Fay PJ. Factor IXa protects factor VIIIa from activated protein C. Factor IXa inhibits activated protein C-catalyzed cleavage of factor VIIIa at Arg562. *J Biol Chem* 1994; **269**: 9445-52.
87. Varadi K, Rosing J, Tans G, Pabinger I, Keil B, Schwarz HP. Factor V enhances the cofactor function of protein S in the APC-mediated inactivation of factor VIII: influence of the factor VR506Q mutation. *Thromb Haemost* 1996; **76**: 208-14.
88. Rezaie AR, Cooper ST, Church FC, Esmon CT. Protein C inhibitor is a potent inhibitor of the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1995; **270**: 25336-9.
89. España F, Gruber A, Heeb MJ, Hanson SR, Harker LA, Griffin JH. In vivo and in vitro complexes of activated protein C with two inhibitors in baboons. *Blood* 1991; **77**: 1754-60.
90. Heeb MJ, España F, Griffin JH. Inhibition and complexation of activated protein C by two major inhibitors in plasma. *Blood* 1989; **73**: 446-54.
91. Scully MF, Toh CH, Hoogendoorn H, Manuel RP, Nesheim ME, Solymoss S, Giles AR. Activation of protein C and its distribution between its inhibitors, protein C inhibitor, alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin, in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 1993; **69**: 448-53.
92. Dahlbäck B, Stenflo J. High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; **78**: 2512-6.
93. Dahlbäck B. Inhibition of protein C cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *J Biol Chem* 1986; **261**: 12022-7.
94. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; **68**: 1370-3.
95. Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 1984; **64**: 1297-300.
96. Griffin JH, Heeb MJ, Schwarz HP. Plasma protein S deficiency and thromboembolic disease. *Prog Hematol* 1987; **15**: 39-49.



## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

97. Schwarz HP, Heeb MJ, Lottenberg R, Roberts H, Griffin JH. Familial protein S deficiency with a variant protein S molecule in plasma and platelets. *Blood* 1989; **74**: 213-21.
98. Estellés A, García-Plaza I, Dasí A, Aznar J, Duart M, Sanz G, Pérez-Requejo JL, España F, Jiménez C, Abeledo G. Severe inherited "homozygous" protein C deficiency in a newborn infant. *Thromb Haemost* 1984; **52**: 53-6.
99. Seligsohn U, Berger A, Abend M, Rubin L, Attias D, Zivelin A, Rapaport SI. Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in the newborn. *N Engl J Med* 1984; **310**: 559-62.
100. Sills RH, Marlar RA, Montgomery RR, Deshpande GN, Humbert JR. Severe homozygous protein C deficiency. *J Pediatr* 1984; **105**: 409-13.
101. Auberger K. Evaluation of a new protein-C concentrate and comparison of protein-C assays in a child with congenital protein-C deficiency. *Ann Hematol* 1992; **64**: 146-51.
102. Baliga V, Thwaites R, Tillyer ML, Minford A, Parapia L, Allgrove J. Homozygous protein C deficiency--management with protein C concentrate. *Eur J Pediatr* 1995; **154**: 534-8.
103. Minford AM, Parapia LA, Stainforth C, Lee D. Treatment of homozygous protein C deficiency with subcutaneous protein C concentrate. *Br J Haematol* 1996; **93**: 215-6.
104. Smith OP, White B, Vaughan D, Rafferty M, Claffey L, Lyons B, Casey W. Use of protein-C concentrate, heparin, and haemodiafiltration in meningococcus-induced purpura fulminans. *Lancet* 1997; **350**: 1590-3.
105. White B, Livingstone W, Murphy C, Hodgson A, Rafferty M, Smith OP. An open-label study of the role of adjuvant hemostatic support with protein C replacement therapy in purpura fulminans-associated meningococemia. *Blood* 2000; **96**: 3719-24.
106. Manco-Johnson MJ, Knapp-Clevenger R. Activated protein C concentrate reverses purpura fulminans in severe genetic protein C deficiency. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; **26**: 25-7.
107. Okajima K, Imamura H, Koga S, Inoue M, Takatsuki K, Aoki N. Treatment of patients with disseminated intravascular coagulation by protein C. *Am J Hematol* 1990; **33**: 277-8.
108. Aoki N, Matsuda T, Saito H, Takatsuki K, Okajima K, Takahashi H, Takamatsu J, Asakura H, Ogawa N. A comparative double-blind randomized trial of activated protein C and unfractionated heparin in the treatment of disseminated intravascular coagulation. *Int J Hematol* 2002; **75**: 540-7.
109. Gruber A, Hanson SR. Potential new targets for antithrombotic therapy. *Curr Pharm Des* 2003; **9**: 2367-74.

110. Gruber A, Griffin JH, Harker LA, Hanson SR. Inhibition of platelet-dependent thrombus formation by human activated protein C in a primate model. *Blood* 1989; **73**: 639-42.
111. Gruber A, Hanson SR, Kelly AB, Yan BS, Bang N, Griffin JH, Harker LA. Inhibition of thrombus formation by activated recombinant protein C in a primate model of arterial thrombosis. *Circulation* 1990; **82**: 578-85.
112. Gruber A, Harker LA, Hanson SR, Kelly AB, Griffin JH. Antithrombotic effects of combining activated protein C and urokinase in nonhuman primates. *Circulation* 1991; **84**: 2454-62.
113. Hanson SR, Griffin JH, Harker LA, Kelly AB, Esmon CT, Gruber A. Antithrombotic effects of thrombin-induced activation of endogenous protein C in primates. *J Clin Invest* 1993; **92**: 2003-12.
114. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; **369**: 64-7.
115. España F, Vicente V, Tabernero D, Scharrer I, Griffin JH. Determination of plasma protein C inhibitor and of two activated protein C-inhibitor complexes in normals and in patients with intravascular coagulation and thrombotic disease. *Thromb Res* 1990; **59**: 593-608.
116. Tabernero D, España F, Vicente V, Estellés A, Gilabert J, Aznar J. Protein C inhibitor and other components of the protein C pathway in patients with acute deep vein thrombosis during heparin treatment. *Thromb Haemost* 1990; **63**: 380-2.
117. Vicente V, España F, Tabernero D, Estellés A, Aznar J, Hendl S, Griffin JH. Evidence of activation of the protein C pathway during acute vascular damage induced by Mediterranean spotted fever. *Blood* 1991; **78**: 416-22.
118. España F, Gilabert J, Aznar J, Estellés A, Kobayashi T, Griffin JH. Complexes of activated protein C with alpha 1-antitrypsin in normal pregnancy and in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1991; **164**: 1310-6.
119. España F, Gilabert J, Vicente V, Estellés A, Vázquez L, Hendl S, Aznar J. Activated protein C: alpha 1-antitrypsin (APC: alpha 1 AT) complex as a marker for in vitro diagnosis of prethrombotic states. *Thromb Res* 1992; **66**: 499-508.
120. Hoogendoorn H, Toh CH, Nesheim ME, Giles AR. Alpha 2-macroglobulin binds and inhibits activated protein C. *Blood* 1991; **78**: 2283-90.
121. España F, Zorio E, Medina P, Osa A, Estellés A, Palencia M, Navarro S, Aznar J. Low levels of circulating activated protein C are a risk factor for myocardial infarction. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; **32 (Suppl 2)**: 61.
122. Navarro S, Ricart JM, Medina P, Vayá A, Villa P, Todolí J, Estellés A, Micó ML, Aznar J, España F. Activated protein C levels in Behcet's disease and risk of venous thrombosis. *Br J Haematol* 2004; **126**: 550-6.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

123. Medina P, Navarro S, Estellés A, Aznar J, Bertina RM, España F. The Multifunctional Protein C System. *Current Medicinal Chemistry - Cardiovascular and Haematological Agents*. In press 2005
124. Esmon CT, Fukudome K, Mather T, Bode W, Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S. Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica* 1999; **84**: 254-9.
125. Esmon CT, Fukudome K. Cellular regulation of the protein C pathway. *Semin Cell Biol* 1995; **6**: 259-68.
126. Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, Laszik Z, Esmon CT, Heyderman RS. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med* 2001; **345**: 408-16.
127. Liaw PC, Ferrell G, Esmon CT. A monoclonal antibody against activated protein C allows rapid detection of activated protein C in plasma and reveals a calcium ion dependent epitope involved in factor Va inactivation. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 662-70.
128. Esmon CT. Role of coagulation inhibitors in inflammation. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 51-6.
129. Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1986; **163**: 740-5.
130. Nawroth PP, Handley DA, Esmon CT, Stern DM. Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**: 3460-4.
131. Moore KL, Andreoli SP, Esmon NL, Esmon CT, Bang NU. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest* 1987; **79**: 124-30.
132. Conway EM, Rosenberg RD. Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 5588-92.
133. Lentz SR, Tsiang M, Sadler JE. Regulation of thrombomodulin by tumor necrosis factor-alpha: comparison of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Blood* 1991; **77**: 542-50.
134. Takano S, Kimura S, Ohdama S, Aoki N. Plasma thrombomodulin in health and diseases. *Blood* 1990; **76**: 2024-9.
135. Boehme MW, Deng Y, Raeth U, Bierhaus A, Ziegler R, Stremmel W, Nawroth PP. Release of thrombomodulin from endothelial cells by concerted action of TNF-alpha and neutrophils: in vivo and in vitro studies. *Immunology* 1996; **87**: 134-40.

136. Glaser CB, Morser J, Clarke JH, Blasko E, McLean K, Kuhn I, Chang RJ, Lin JH, Vilander L, Andrews WH, et al. Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity. A potential rapid mechanism for modulation of coagulation. *J Clin Invest* 1992; **90**: 2565-73.
137. Slungaard A, Vercellotti GM, Tran T, Gleich GJ, Key NS. Eosinophil cationic granule proteins impair thrombomodulin function. A potential mechanism for thromboembolism in hypereosinophilic heart disease. *J Clin Invest* 1993; **91**: 1721-30.
138. Boerger LM, Morris PC, Thurnau GR, Esmon CT, Comp PC. Oral contraceptives and gender affect protein S status. *Blood* 1987; **69**: 692-4.
139. Gilabert J, Fernández JA, España F, Aznar J, Estellés A. Physiological coagulation inhibitors (protein S, protein C and antithrombin III) in severe preeclamptic states and in users of oral contraceptives. *Thromb Res* 1988; **49**: 319-29.
140. Griffin JH, Mosher DF, Zimmerman TS, Kleiss AJ. Protein C, an antithrombotic protein, is reduced in hospitalized patients with intravascular coagulation. *Blood* 1982; **60**: 261-4.
141. Coughlin SR. Thrombin receptor function and cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 1994; **4**: 77-83.
142. Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost* 1999; **81**: 1-7.
143. Schaub RG, Simmons CA, Koets MH, Romano PJ, 2nd, Stewart GJ. Early events in the formation of a venous thrombus following local trauma and stasis. *Lab Invest* 1984; **51**: 218-24.
144. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992; **359**: 848-51.
145. Wakefield TW, Strieter RM, Schaub R, Myers DD, Prince MR, Wroblewski SK, Londy FJ, Kadell AM, Brown SL, Henke PK, Greenfield LJ. Venous thrombosis prophylaxis by inflammatory inhibition without anticoagulation therapy. *J Vasc Surg* 2000; **31**: 309-24.
146. Taylor FB, Jr., Stern DM, Nawroth PP, Esmon CT, Hinshaw LB, Blick KE. Activated protein C prevents *E. coli* induced coagulopathy and shock in the primate. *Circulation* 1986; **74**: 65a.
147. Taylor FB, Jr., Chang A, Ferrell G, Mather T, Catlett R, Blick KE. C4b-binding protein exacerbates the host response to *Escherichia coli*. *Blood* 1991; **78**: 357-63.

148. Taylor FB, Jr., Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Ferrell G, Chang AC, Laszik Z, Kosanke S, Peer G, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood* 2000; **95**: 1680-6.
149. Grey ST, Tsuchida A, Hau H, Orthner CL, Salem HH, Hancock WW. Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN-gamma, or phorbol ester. *J Immunol* 1994; **153**: 3664-72.
150. Murphy C, Livingstone WJ, White B. Activated protein C inhibits upregulation of both tissue factor and TNF $\alpha$  in endotoxin stimulated monocytes. *Supplement to the journal Thromb Haemost* 2001: P509.
151. Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, Nakagaki T, Okabe H, Takatsuki K. Activated protein C prevents LPS-induced pulmonary vascular injury by inhibiting cytokine production. *Am J Physiol* 1997; **272**: L197-202.
152. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Harada N, Johno M, Naruo M. Activated protein C reduces the severity of compression-induced spinal cord injury in rats by inhibiting activation of leukocytes. *J Neurosci* 1998; **18**: 1393-8.
153. Hirose K, Okajima K, Taoka Y, Uchiba M, Tagami H, Nakano K, Utoh J, Okabe H, Kitamura N. Activated protein C reduces the ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury in rats by inhibiting neutrophil activation. *Ann Surg* 2000; **232**: 272-80.
154. Esmon CT. New mechanisms for vascular control of inflammation mediated by natural anticoagulant proteins. *J Exp Med* 2002; **196**: 561-4.
155. Gu JM, Katsuura Y, Ferrell GL, Grammas P, Esmon CT. Endotoxin and thrombin elevate rodent endothelial cell protein C receptor mRNA levels and increase receptor shedding in vivo. *Blood* 2000; **95**: 1687-93.
156. Kurosawa S, Esmon CT, Stearns-Kurosawa DJ. The soluble endothelial protein C receptor binds to activated neutrophils: involvement of proteinase-3 and CD11b/CD18. *J Immunol* 2000; **165**: 4697-703.
157. Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost* 2000; **83**: 639-43.
158. Shu F, Kobayashi H, Fukudome K, Tsuneyoshi N, Kimoto M, Terao T. Activated protein C suppresses tissue factor expression on U937 cells in the endothelial protein C receptor-dependent manner. *FEBS Lett* 2000; **477**: 208-12.
159. Oganessian V, Oganessian N, Terzyan S, Qu D, Dauter Z, Esmon NL, Esmon CT. The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid. *J Biol Chem* 2002; **277**: 24851-4.

160. Moody DB, Ulrichs T, Mühlecker W, Young DC, Gurcha SS, Grant E, Rosat JP, Brenner MB, Costello CE, Besra GS, Porcelli SA. CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature* 2000; **404**: 884-8.
161. Hong S, Scherer DC, Singh N, Mendiratta SK, Serizawa I, Koezuka Y, Van Kaer L. Lipid antigen presentation in the immune system: lessons learned from CD1d knockout mice. *Immunol Rev* 1999; **169**: 31-44.
162. Liaw PC, Mather T, Oganessian N, Ferrell GL, Esmon CT. Identification of the protein C/activated protein C binding sites on the endothelial cell protein C receptor. Implications for a novel mode of ligand recognition by a major histocompatibility complex class 1-type receptor. *J Biol Chem* 2001; **276**: 8364-70.
163. Beutler B. Toll-like receptors: how they work and what they do. *Curr Opin Hematol* 2002; **9**: 2-10.
164. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 649-83.
165. DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, Suyang H, Ghosh S, Karin M. Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 1295-304.
166. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; **336**: 1066-71.
167. Yao J, Mackman N, Edgington TS, Fan ST. Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun, and NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem* 1997; **272**: 17795-801.
168. Bohrer H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, Jllmer T, Mannel D, Bottiger BW, Stern DM, Waldherr R, Saeger HD, Ziegler R, Bierhaus A, Martin E, Nawroth PP. Role of NFkappaB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest* 1997; **100**: 972-85.
169. Hancock WW, Grey ST, Hau L, Akalin E, Orthner C, Sayegh MH, Salem HH. Binding of activated protein C to a specific receptor on human mononuclear phagocytes inhibits intracellular calcium signaling and monocyte-dependent proliferative responses. *Transplantation* 1995; **60**: 1525-32.
170. White B, Schmidt M, Murphy C, Livingstone W, O'Toole D, Lawler M, O'Neill L, Kelleher D, Schwarz HP, Smith OP. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol* 2000; **110**: 130-4.

171. Xu J, Esmon CT. Endothelial cell protein C receptor (EPCR) constitutively translocates into nucleus and also mediates activated protein C, but not protein C, nuclear translocation. *Supplement to the journal Thromb Haemost* 1999; 206a.
172. Esmon CT, Xu J, Gu JM, Qu D, Laszik Z, Ferrell G, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Taylor FB, Jr., Esmon NL. Endothelial protein C receptor. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 251-8.
173. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001; **276**: 11199-203.
174. Conway EM, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vriese A, Weitz JI, Weiler H, Hellings PW, Schaeffer P, Herbert JM, Collen D, Theilmeier G. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med* 2002; **196**: 565-77.
175. Gonda Y, Hirata S, Saitoh K, Aoki Y, Mohri M, Gomi K, Sugihara T, Kiyota T, Yamamoto S, Ishida T, et al. Antithrombotic effect of recombinant human soluble thrombomodulin on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rats. *Thromb Res* 1993; **71**: 325-35.
176. Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Nawa K, Okabe H, Takatsuki K. Recombinant human soluble thrombomodulin reduces endotoxin-induced pulmonary vascular injury via protein C activation in rats. *Thromb Haemost* 1995; **74**: 1265-70.
177. Hasegawa N, Kandra TG, Husari AW, Veiss S, Hart WT, Hedgpeth J, Wydro R, Raffin TA. The effects of recombinant human thrombomodulin on endotoxin-induced multiple-system organ failure in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; **153**: 1831-7.
178. Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Johno M, Okabe H, Takatsuki K. Recombinant thrombomodulin prevents endotoxin-induced lung injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Am J Physiol* 1996; **271**: L470-5.
179. Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Johno M, Mohri M, Okabe H, Takatsuki K. rhs-TM prevents ET-induced increase in pulmonary vascular permeability through protein C activation. *Am J Physiol* 1997; **273**: L889-94.
180. Hancock WW, Tsuchida A, Hau H, Thomson NM, Salem HH. The anticoagulants protein C and protein S display potent antiinflammatory and immunosuppressive effects relevant to transplant biology and therapy. *Transplant Proc* 1992; **24**: 2302-3.
181. Petersen TE. The amino-terminal domain of thrombomodulin and pancreatic stone protein are homologous with lectins. *FEBS Lett* 1988; **231**: 51-3.

182. Drickamer K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* 1988; **263**: 9557-60.
183. Vasta GR, Quesenberry M, Ahmed H, O'Leary N. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Dev Comp Immunol* 1999; **23**: 401-20.
184. Crockett-Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J Leukoc Biol* 1998; **63**: 1-14.
185. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med* 2000; **28**: 1379-86.
186. Huang HC, Shi GY, Jiang SJ, Shi CS, Wu CM, Yang HY, Wu HL. Thrombomodulin-mediated cell adhesion: involvement of its lectin-like domain. *J Biol Chem* 2003; **278**: 46750-9.
187. Zushi M, Gomi K, Yamamoto S, Maruyama I, Hayashi T, Suzuki K. The last three consecutive epidermal growth factor-like structures of human thrombomodulin comprise the minimum functional domain for protein C-activating cofactor activity and anticoagulant activity. *J Biol Chem* 1989; **264**: 10351-3.
188. Nawa K, Ono M, Fujiwara H, Sugiyama N, Uchiyama T, Marumoto Y. Monoclonal antibodies against human thrombomodulin whose epitope is located in epidermal growth factor-like domains. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1205**: 162-70.
189. Tsiang M, Lentz SR, Sadler JE. Functional domains of membrane-bound human thrombomodulin. EGF-like domains four to six and the serine/threonine-rich domain are required for cofactor activity. *J Biol Chem* 1992; **267**: 6164-70.
190. Hayashi T, Zushi M, Yamamoto S, Suzuki K. Further localization of binding sites for thrombin and protein C in human thrombomodulin. *J Biol Chem* 1990; **265**: 20156-9.
191. Lentz SR, Chen Y, Sadler JE. Sequences required for thrombomodulin cofactor activity within the fourth epidermal growth factor-like domain of human thrombomodulin. *J Biol Chem* 1993; **268**: 15312-7.
192. Clarke JH, Light DR, Blasko E, Parkinson JF, Nagashima M, McLean K, Vilander L, Andrews WH, Morser J, Glaser CB. The short loop between epidermal growth factor-like domains 4 and 5 is critical for human thrombomodulin function. *J Biol Chem* 1993; **268**: 6309-15.
193. Suzuki K, Hayashi T, Nishioka J, Kosaka Y, Zushi M, Honda G, Yamamoto S. A domain composed of epidermal growth factor-like structures of human thrombomodulin is essential for thrombin binding and for protein C activation. *J Biol Chem* 1989; **264**: 4872-6.



194. Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1996; **271**: 16603-8.
195. Campbell W, Okada N, Okada H. Carboxypeptidase R is an inactivator of complement-derived inflammatory peptides and an inhibitor of fibrinolysis. *Immunol Rev* 2001; **180**: 162-7.
196. Campbell WD, Lazoura E, Okada N, Okada H. Inactivation of C3a and C5a octapeptides by carboxypeptidase R and carboxypeptidase N. *Microbiol Immunol* 2002; **46**: 131-4.
197. Hamada H, Ishii H, Sakyo K, Horie S, Nishiki K, Kazama M. The epidermal growth factor-like domain of recombinant human thrombomodulin exhibits mitogenic activity for Swiss 3T3 cells. *Blood* 1995; **86**: 225-33.
198. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest* 2003; **124**: 26S-32S.
199. Honda G, Masaki C, Zushi M, Tsuruta K, Sata M. The roles played by the D2 and D3 domains of recombinant human thrombomodulin in its function. *J Biochem (Tokyo)* 1995; **118**: 1030-6.
200. Nawa K, Sakano K, Fujiwara H, Sato Y, Sugiyama N, Teruuchi T, Iwamoto M, Marumoto Y. Presence and function of chondroitin-4-sulfate on recombinant human soluble thrombomodulin. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **171**: 729-37.
201. Bourin MC, Lindahl U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochem J* 1993; **289 ( Pt 2)**: 313-30.
202. Esmon CT. Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *Faseb J* 1995; **9**: 946-55.
203. Bajzar L, Nesheim ME, Tracy PB. The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent. *Blood* 1996; **88**: 2093-100.
204. Nesheim M, Wang W, Boffa M, Nagashima M, Morser J, Bajzar L. Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 386-91.
205. Vervloet MG, Thijs LG, Hack CE. Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin Thromb Hemost* 1998; **24**: 33-44.
206. Iba T, Kidokoro A, Yagi Y. The role of the endothelium in changes in procoagulant activity in sepsis. *J Am Coll Surg* 1998; **187**: 321-9.
207. Esmon CT. Inflammation and thrombosis: mutual regulation by protein C. *Immunologist* 1998; **6**: 84-9.

208. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999; **341**: 586-92.
209. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, López-Rodríguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ, Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; **344**: 699-709.
210. Ohdama S, Matsubara O, Aoki N. Plasma thrombomodulin in Wegener's granulomatosis as an indicator of vascular injuries. *Chest* 1994; **106**: 666-71.
211. Laszik ZG, Zhou XJ, Ferrell GL, Silva FG, Esmon CT. Down-regulation of endothelial expression of endothelial cell protein C receptor and thrombomodulin in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol* 2001; **159**: 797-802.
212. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997; **112**: 235-43.
213. Manco-Johnson MJ, Nuss R, Key N, Moertel C, Jacobson L, Meech S, Weinberg A, Lefkowitz J. Lupus anticoagulant and protein S deficiency in children with postvaricella purpura fulminans or thrombosis. *J Pediatr* 1996; **128**: 319-23.
214. Grey ST, Hancock WW. A physiologic anti-inflammatory pathway based on thrombomodulin expression and generation of activated protein C by human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1996; **156**: 2256-63.
215. Taylor FB, Jr., Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick KE. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of Escherichia coli infusion in the baboon. *J Clin Invest* 1987; **79**: 918-25.
216. Fisher CJ, Jr., Yan SB. Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases. *Crit Care Med* 2000; **28**: S49-56.
217. Powars DR, Rogers ZR, Patch MJ, McGehee WG, Francis RB, Jr. Purpura fulminans in meningococemia: association with acquired deficiencies of proteins C and S. *N Engl J Med* 1987; **317**: 571-2.
218. Gerson WT, Dickerman JD, Bovill EG, Golden E. Severe acquired protein C deficiency in purpura fulminans associated with disseminated intravascular coagulation: treatment with protein C concentrate. *Pediatrics* 1993; **91**: 418-22.
219. Rintala E, Seppala OP, Kotilainen P, Pettila V, Rasi V. Protein C in the treatment of coagulopathy in meningococcal disease. *Crit Care Med* 1998; **26**: 965-8.
220. Smith OP, White B. Infectious purpura fulminans: diagnosis and treatment. *Br J Haematol* 1999; **104**: 202-7.
221. Rivard GE, David M, Farrell C, Schwarz HP. Treatment of purpura fulminans in meningococemia with protein C concentrate. *J Pediatr* 1995; **126**: 646-52.

222. Faust SN, Heyderman RS, Harrison O, Goldin RD, Laszik Z, Esmon CT. Molecular mechanisms of thrombosis in meningococcal septicaemia: the role of the protein C pathway in vivo. *Proceedings of the 2nd Annual Meeting of the British Infection Society*. London; 1999
223. Hartman DL, Bernard GR, Helterbrand JD, Yan SB, Fisher CJ. Recombinant human activated protein C (RhAPC) improves coagulation abnormalities associated with severe sepsis. *Intensive Care Med* 1998; **24**: S77.
224. Waugh JM, Li-Hawkins J, Yuksel E, Kuo MD, Cifra PN, Hilfiker PR, Geske R, Chawla M, Thomas J, Shenaq SM, Dake MD, Woo SL. Thrombomodulin overexpression to limit neointima formation. *Circulation* 2000; **102**: 332-7.
225. Kim AY, Walinsky PL, Kolodgie FD, Bian C, Sperry JL, Deming CB, Peck EA, Shake JG, Ang GB, Sohn RH, Esmon CT, Virmani R, Stuart RS, Rade JJ. Early loss of thrombomodulin expression impairs vein graft thromboresistance: implications for vein graft failure. *Circ Res* 2002; **90**: 205-12.
226. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 2002; **296**: 1880-2.
227. Mosnier LO, Griffin JH. Inhibition of staurosporine-induced apoptosis of endothelial cells by activated protein C requires protease-activated receptor-1 and endothelial cell protein C receptor. *Biochem J* 2003; **373**: 65-70.
228. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernández JA, Castellino F, Rosen ED, Fukudome K, Zlokovic BV. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med* 2003; **9**: 338-42.
229. del Zoppo GJ. tPA: a neuron buster, too? *Nat Med* 1998; **4**: 148-50.
230. Zivin JA. Factors determining the therapeutic window for stroke. *Neurology* 1998; **50**: 599-603.
231. Chopp M, Zhang RL, Chen H, Li Y, Jiang N, Rusche JR. Postischemic administration of an anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1994; **25**: 869-75; discussion 75-6.
232. Connolly ES, Jr., Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ. Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 1996; **97**: 209-16.
233. Benjelloun N, Renolleau S, Represa A, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. Inflammatory responses in the cerebral cortex after ischemia in the P7 neonatal Rat. *Stroke* 1999; **30**: 1916-23; discussion 23-4.
234. del Zoppo GJ. Microvascular responses to cerebral ischemia/inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1997; **823**: 132-47.

235. Folsom AR, Rosamond WD, Shahar E, Cooper LS, Aleksic N, Nieto FJ, Rasmussen ML, Wu KK. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Circulation* 1999; **100**: 736-42.
236. Macko RF, Ameriso SF, Gruber A, Griffin JH, Fernández JA, Barndt R, Quismorio FP, Jr., Weiner JM, Fisher M. Impairments of the protein C system and fibrinolysis in infection-associated stroke. *Stroke* 1996; **27**: 2005-11.
237. Fisher M, Fernández JA, Ameriso SF, Xie D, Gruber A, Paganini-Hill A, Griffin JH. Activated protein C resistance in ischemic stroke not due to factor V arginine506-->glutamine mutation. *Stroke* 1996; **27**: 1163-6.
238. van der Bom JG, Bots ML, Haverkate F, Slagboom PE, Meijer P, de Jong PT, Hofman A, Grobbee DE, Kluft C. Reduced response to activated protein C is associated with increased risk for cerebrovascular disease. *Ann Intern Med* 1996; **125**: 265-9.
239. Meschia JF, Biller J. Manipulation of coagulation factors in acute stroke. *Drugs* 1997; **54 Suppl 3**: 71-81; discussion 81-2.
240. Alexandrov AV, Black SE, Ehrlich LE, Caldwell CB, Norris JW. Predictors of hemorrhagic transformation occurring spontaneously and on anticoagulants in patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 1997; **28**: 1198-202.
241. del Zoppo GJ, Copeland BR, Anderchek K, Hacke W, Koziol JA. Hemorrhagic transformation following tissue plasminogen activator in experimental cerebral infarction. *Stroke* 1990; **21**: 596-601.
242. Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. The NINDS t-PA Stroke Study Group. *Stroke* 1997; **28**: 2109-18.
243. Arnljots B, Bergqvist D, Dahlbäck B. Inhibition of microarterial thrombosis by activated protein C in a rabbit model. *Thromb Haemost* 1994; **72**: 415-20.
244. Arnljots B, Dahlbäck B. Antithrombotic effects of activated protein C and protein S in a rabbit model of microarterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; **15**: 937-41.
245. Macko RF, Killewich LA, Fernández JA, Cox DK, Gruber A, Griffin JH. Brain-specific protein C activation during carotid artery occlusion in humans. *Stroke* 1999; **30**: 542-5.
246. Petäjä J, Pesonen E, Fernández JA, Vento AE, Ramo OJ, Griffin JH. Cardiopulmonary bypass and activation of antithrombotic plasma protein C. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; **118**: 422-9; discussion 29-31.
247. Shibata M, Kumar SR, Amar A, Fernández JA, Hofman F, Griffin JH, Zlokovic BV. Anti-inflammatory, antithrombotic, and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke. *Circulation* 2001; **103**: 1799-805.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

248. Fernández JA, Xu X, Liu D, Zlokovic BV, Griffin JH. Recombinant murine-activated protein C is neuroprotective in a murine ischemic stroke model. *Blood Cells Mol Dis* 2003; **30**: 271-6.
249. Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, Insalaco R, Fernández JA, Griffin JH, Zlokovic BV. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron* 2004; **41**: 563-72.
250. Miletich J, Sherman L, Broze G, Jr. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 1987; **317**: 991-6.
251. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, Islam SI, McCall F, Poort SR, Conkie JA, Bertina RM. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* 1995; **73**: 87-93.
252. Tomczak JA, Ando RA, Sobel HG, Bovill EG, Long GL. Genetic analysis of a large kindred exhibiting type I protein C deficiency and associated thrombosis. *Thromb Res* 1994; **74**: 243-54.
253. Koeleman BP, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C-deficient families. *Blood* 1994; **84**: 1031-5.
254. Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J. Increased risk of venous thrombosis in carriers of natural anticoagulant deficiencies. Results of the family studies of the Spanish Multicenter Study on Thrombophilia (EMET study). *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; **9**: 71-8.
255. Mustafa S, Mannhalter C, Rintelen C, Kyrle PA, Knobl P, Lechner K, Pabinger I. Clinical features of thrombophilia in families with gene defects in protein C or protein S combined with factor V Leiden. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; **9**: 85-9.
256. Branson HE, Katz J, Marble R, Griffin JH. Inherited protein C deficiency and coumarin-responsive chronic relapsing purpura fulminans in a newborn infant. *Lancet* 1983; **2**: 1165-8.
257. Dreyfus M, Magny JF, Bridey F, Schwarz HP, Planche C, Dehan M, Tchernia G. Treatment of homozygous protein C deficiency and neonatal purpura fulminans with a purified protein C concentrate. *N Engl J Med* 1991; **325**: 1565-8.
258. Dreyfus M, Masterson M, David M, Rivard GE, Muller FM, Kreuz W, Beeg T, Minford A, Allgrove J, Cohen JD, et al. Replacement therapy with a monoclonal antibody purified protein C concentrate in newborns with severe congenital protein C deficiency. *Semin Thromb Hemost* 1995; **21**: 371-81.
259. Simmonds RE, Ireland H, Lane DA, Zöller B, García de Frutos P, Dahlbäck B. Clarification of the risk for venous thrombosis associated with hereditary protein S deficiency by investigation of a large kindred with a characterized gene defect. *Ann Intern Med* 1998; **128**: 8-14.

260. Dahlbäck B. Physiological anticoagulation. Resistance to activated protein C and venous thromboembolism. *J Clin Invest* 1994; **94**: 923-7.
261. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernández JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; **82**: 1989-93.
262. Nicolaes GA, Tans G, Thomassen MC, Hemker HC, Pabinger I, Varadi K, Schwarz HP, Rosing J. Peptide bond cleavages and loss of functional activity during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem* 1995; **270**: 21158-66.
263. Rosing J, Hoekema L, Nicolaes GA, Thomassen MC, Hemker HC, Varadi K, Schwarz HP, Tans G. Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem* 1995; **270**: 27852-8.
264. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 1004-8.
265. Zöller B, Berntsdotter A, García de Frutos P, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood* 1995; **85**: 3518-23.
266. van Boven HH, Reitsma PH, Rosendaal FR, Bayston TA, Chowdhury V, Bauer KA, Scharrer I, Conard J, Lane DA. Factor V Leiden (FV R506Q) in families with inherited antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* 1996; **75**: 417-21.
267. Meinardi JR, Middeldorp S, de Kam PJ, Koopman MM, van Pampus EC, Hamulyak K, Prins MH, Buller HR, van der Meer J. Risk of venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden with a concomitant inherited thrombophilic defect: a retrospective analysis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; **12**: 713-20.
268. Vandenbroucke JP, Koster T, Briët E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* 1994; **344**: 1453-7.
269. Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Buller HR, Vandenbroucke JP. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet* 1995; **346**: 1593-6.
270. Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, Miletich JP, Malinow MR, Stampfer MJ. Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation* 1997; **95**: 1777-82.
271. Ridker PM, Miletich JP, Stampfer MJ, Goldhaber SZ, Lindpaintner K, Hennekens CH. Factor V Leiden and risks of recurrent idiopathic venous thromboembolism. *Circulation* 1995; **92**: 2800-2.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

272. Simioni P, Prandoni P, Lensing AW, Scudeller A, Sardella C, Prins MH, Villalta S, Dazzi F, Girolami A. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with an Arg506-->Gln mutation in the gene for factor V (factor V Leiden). *N Engl J Med* 1997; **336**: 399-403.
273. Ridker PM, Glynn RJ, Miletich JP, Goldhaber SZ, Stampfer MJ, Hennekens CH. Age-specific incidence rates of venous thromboembolism among heterozygous carriers of factor V Leiden mutation. *Ann Intern Med* 1997; **126**: 528-31.
274. Comp PC, Thurnau GR, Welsh J, Esmon CT. Functional and immunologic protein S levels are decreased during pregnancy. *Blood* 1986; **68**: 881-5.
275. Bokarewa MI, Bremme K, Blomback M. Arg506-Gln mutation in factor V and risk of thrombosis during pregnancy. *Br J Haematol* 1996; **92**: 473-8.
276. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Beverly RK, Psaty BM, Longstreth WT, Jr., Raghunathan TE, Koepsell TD, Reitsma PH. Factor V Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; **89**: 2817-21.
277. Meinardi JR, Henkens CM, Heringa MP, van der Meer J. Acquired APC resistance related to oral contraceptives and pregnancy and its possible implications for clinical practice. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997; **8**: 152-4.
278. de Visser MC, Rosendaal FR, Bertina RM. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. *Blood* 1999; **93**: 1271-6.
279. Galli M, Ruggeri L, Barbui T. Differential effects of anti-beta2-glycoprotein I and antiprothrombin antibodies on the anticoagulant activity of activated protein C. *Blood* 1998; **91**: 1999-2004.
280. Smirnov MD, Triplett DT, Comp PC, Esmon NL, Esmon CT. On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* 1995; **95**: 309-16.
281. Ireland H, Kunz G, Kyriakoulis K, Stubbs PJ, Lane DA. Thrombomodulin gene mutations associated with myocardial infarction. *Circulation* 1997; **96**: 15-8.
282. Norlund L, Holm J, Zöller B, Öhlin AK. A common thrombomodulin amino acid dimorphism is associated with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1997; **77**: 248-51.
283. Doggen CJ, Kunz G, Rosendaal FR, Lane DA, Vos HL, Stubbs PJ, Manger Cats V, Ireland H. A mutation in the thrombomodulin gene, 127G to A coding for Ala25Thr, and the risk of myocardial infarction in men. *Thromb Haemost* 1998; **80**: 743-8.
284. Norlund L, Zöller B, Öhlin AK. A novel thrombomodulin gene mutation in a patient suffering from sagittal sinus thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 1164-6.

285. Öhlin AK, Marlar RA. The first mutation identified in the thrombomodulin gene in a 45-year-old man presenting with thromboembolic disease. *Blood* 1995; **85**: 330-6.
286. Öhlin AK, Norlund L, Marlar RA. Thrombomodulin gene variations and thromboembolic disease. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 396-400.
287. van der Velden PA, Krommenhoek-Van Es T, Allaart CF, Bertina RM, Reitsma PH. A frequent thrombomodulin amino acid dimorphism is not associated with thrombophilia. *Thromb Haemost* 1991; **65**: 511-3.
288. Weiler-Guettler H, Christie PD, Beeler DL, Healy AM, Hancock WW, Rayburn H, Edelberg JM, Rosenberg RD. A targeted point mutation in thrombomodulin generates viable mice with a prethrombotic state. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1983-91.
289. Jalbert LR, Rosen ED, Moons L, Chan JC, Carmeliet P, Collen D, Castellino FJ. Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1481-8.
290. Simmonds RE, Lane DA. Structural and functional implications of the intron/exon organization of the human endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR) gene: comparison with the structure of CD1/major histocompatibility complex alpha1 and alpha2 domains. *Blood* 1999; **94**: 632-41.
291. Hayashi T, Nakamura H, Okada A, Takebayashi S, Wakita T, Yuasa H, Okumura K, Suzuki K. Organization and chromosomal localization of the human endothelial protein C receptor gene. *Gene* 1999; **238**: 367-73.
292. Ye X, Fukudome K, Tsuneyoshi N, Satoh T, Tokunaga O, Sugawara K, Mizokami H, Kimoto M. The endothelial cell protein C receptor (EPCR) functions as a primary receptor for protein C activation on endothelial cells in arteries, veins, and capillaries. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **259**: 671-7.
293. Fukudome K, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, He X, Rezaie AR, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. *J Biol Chem* 1996; **271**: 17491-8.
294. Wen DZ, Dittman WA, Ye RD, Deaven LL, Majerus PW, Sadler JE. Human thrombomodulin: complete cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry* 1987; **26**: 4350-7.
295. Espinosa R, 3rd, Sadler JE, Le Beau MM. Regional localization of the human thrombomodulin gene to 20p12-cen. *Genomics* 1989; **5**: 649-50.
296. Yasuda K, Espinosa R, 3rd, Davis EM, Le Beau MM, Bell GI. Human somatostatin receptor genes: localization of SSTR5 to human chromosome 20p11.2. *Genomics* 1993; **17**: 785-6.
297. Maglott DR, Feldblyum TV, Durkin AS, Nierman WC. Radiation hybrid mapping of SNAP, PCSK2, and THBD (human chromosome 20p). *Mamm Genome* 1996; **7**: 400-1.



298. Jackman RW, Beeler DL, Fritze L, Soff G, Rosenberg RD. Human thrombomodulin gene is intron depleted: nucleic acid sequences of the cDNA and gene predict protein structure and suggest sites of regulatory control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**: 6425-9.
299. Aleksic N, Folsom AR, Cushman M, Heckbert SR, Tsai MY, Wu KK. Prospective study of the A455V polymorphism in the thrombomodulin gene, plasma thrombomodulin, and incidence of venous thromboembolism: the LITE Study. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 88-94.
300. Wu KK, Aleksic N, Ahn C, Boerwinkle E, Folsom AR, Juneja H. Thrombomodulin Ala455Val polymorphism and risk of coronary heart disease. *Circulation* 2001; **103**: 1386-9.
301. Nakabayashi M, Yamamoto S, Suzuki K. Analysis of thrombomodulin gene polymorphism in women with severe early-onset preeclampsia. *Semin Thromb Hemost* 1999; **25**: 473-9.
302. Faioni EM, Merati G, Peyvandi F, Bettini PM, Mannucci PM. The G1456 to T mutation in the thrombomodulin gene is not frequent in patients with venous thrombosis. *Blood* 1997; **89**: 1467.
303. Nakazawa F, Koyama T, Saito T, Shibakura M, Yoshinaga H, Chung DH, Kamiyama R, Hirose S. Thrombomodulin with the Asp468Tyr mutation is expressed on the cell surface with normal cofactor activity for protein C activation. *Br J Haematol* 1999; **106**: 416-20.
304. Kunz G, Öhlin AK, Adami A, Zöller B, Svensson P, Lane DA. Naturally occurring mutations in the thrombomodulin gene leading to impaired expression and function. *Blood* 2002; **99**: 3646-53.
305. Öhlin AK, Marlar RA. Thrombomodulin gene defects in families with thromboembolic disease--a report on four families. *Thromb Haemost* 1999; **81**: 338-44.
306. Norlund L, Holm J, Zöller B, Öhlin AK. The Ala25-Thr mutation in the thrombomodulin gene is not frequent in Swedish patients suffering from ischemic heart disease. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 1367-8.
307. Warner D, Catto A, Kunz G, Ireland H, Grant PJ, Lane DA. The thrombomodulin gene mutation G(127)-->A (Ala25Thr) and cerebrovascular disease. *Cerebrovasc Dis* 2000; **10**: 359-63.
308. Li YH, Chen JH, Wu HL, Shi GY, Huang HC, Chao TH, Tsai WC, Tsai LM, Guo HR, Wu WS, Chen ZC. G-33A mutation in the promoter region of thrombomodulin gene and its association with coronary artery disease and plasma soluble thrombomodulin levels. *Am J Cardiol* 2000; **85**: 8-12.
309. Li YH, Chen CH, Yeh PS, Lin HJ, Chang BI, Lin JC, Guo HR, Wu HL, Shi GY, Lai ML, Chen JH. Functional mutation in the promoter region of thrombomodulin gene in relation to carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2001; **154**: 713-9.

310. Li YH, Chen JH, Tsai WC, Chao TH, Guo HR, Tsai LM, Wu HL, Shi GY. Synergistic effect of thrombomodulin promoter -33G/A polymorphism and smoking on the onset of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2002; **87**: 86-91.
311. Le Flem L, Picard V, Emmerich J, Gandrille S, Fiessinger JN, Aiach M, Alhenc-Gelas M. Mutations in promoter region of thrombomodulin and venous thromboembolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; **19**: 1098-104.
312. Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RT, Hamerton JL. Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat Cell Mol Genet* 1987; **13**: 285-92.
313. Degen SJ, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry* 1987; **26**: 6165-77.
314. Chow BK, Ting V, Tufaro F, MacGillivray RT. Characterization of a novel liver-specific enhancer in the human prothrombin gene. *J Biol Chem* 1991; **266**: 18927-33.
315. Bancroft JD, McDowell SA, Degen SJ. The human prothrombin gene: transcriptional regulation in HepG2 cells. *Biochemistry* 1992; **31**: 12469-76.
316. Bancroft JD, Schaefer LA, Degen SJ. Characterization of the Alu-rich 5'-flanking region of the human prothrombin-encoding gene: identification of a positive cis-acting element that regulates liver-specific expression. *Gene* 1990; **95**: 253-60.
317. Degen SJ. The prothrombin gene and its liver-specific expression. *Semin Thromb Hemost* 1992; **18**: 230-42.
318. Ceelie H, Bertina RM, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Vos HL. Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 1066-70.
319. Akhavan S, Lavoretano S, Chantarangkul V, Mannucci PM. Plasma prothrombin levels are not associated with mutations in the promoter region of the prothrombin gene. *Thromb Haemost* 2002; **88**: 877-8.
320. Ceelie H, Spaargaren-Van Riel CC, De Jong M, Bertina RM, Vos HL. Functional characterization of transcription factor binding sites for HNF1-alpha, HNF3-beta (FOXA2), HNF4-alpha, Sp1 and Sp3 in the human prothrombin gene enhancer. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 1688-98.
321. Ratcliffe JV, Furie B, Furie BC. The importance of specific gamma-carboxyglutamic acid residues in prothrombin. Evaluation by site-specific mutagenesis. *J Biol Chem* 1993; **268**: 24339-45.
322. Quick AJ, Pisciotta AV, Hussey CV. Congenital hypoprothrombinemic states. *AMA Arch Intern Med* 1955; **95**: 2-14.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

323. Rabet MJ, Furie BC, Furie B. Molecular defect of prothrombin Barcelona. Substitution of cysteine for arginine at residue 273. *J Biol Chem* 1986; **261**: 15045-8.
324. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; **88**: 3698-703.
325. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Vos HL. A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; **90**: 1747-50.
326. Doggen CJ, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation* 1998; **97**: 1037-41.
327. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Rossi E, Chiusolo P, Casorelli I, Leone G. The risk of recurrent venous thromboembolism among heterozygous carriers of the G20210A prothrombin gene mutation. *Br J Haematol* 2001; **113**: 630-5.
328. Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze MW, Kulozik AE. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet* 2001; **28**: 389-92.
329. Carter AM, Sachchithananthan M, Stasinopoulos S, Maurer F, Medcalf RL. Prothrombin G20210A is a bifunctional gene polymorphism. *Thromb Haemost* 2002; **87**: 846-53.
330. Pollak ES, Lam HS, Russell JE. The G20210A mutation does not affect the stability of prothrombin mRNA in vivo. *Blood* 2002; **100**: 359-62.
331. Ceelie H, Spaargaren-van Riel CC, Bertina RM, Vos HL. G20210A is a functional mutation in the prothrombin gene; effect on protein levels and 3'-end formation. *J Thromb Haemost* 2004; **2**: 119-27.
332. Gelfi C, Vigano A, Ripamonti M, Wait R, Begum S, Biguzzi E, Castaman G, Faioni EM. A proteomic analysis of changes in prothrombin and plasma proteins associated with the G20210A mutation. *Proteomics* 2004; **4**: 2151-9.
333. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998; **79**: 706-8.
334. Naylor SL, Marshall A, Solomon A, Long G. Mapping human protein C and protein S to chromosomes 2 and 3, respectively. *Cytogenet Cell Genet* 1987; **46**: 669.

335. Long GL, Marshall A, Gardner JC, Naylor SL. Genes for human vitamin K-dependent plasma proteins C and S are located on chromosomes 2 and 3, respectively. *Somat Cell Mol Genet* 1988; **14**: 93-8.
336. Kato A, Miura O, Sumi Y, Aoki N. Assignment of the human protein C gene (PROC) to chromosome region 2q14-q21 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1988; **47**: 46-7.
337. Patracchini P, Aiello V, Palazzi P, Calzolari E, Bernardi F. Sublocalization of the human protein C gene on chromosome 2q13-q14. *Hum Genet* 1989; **81**: 191-2.
338. Plutzky J, Hoskins JA, Long GL, Crabtree GR. Evolution and organization of the human protein C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**: 546-50.
339. Miao CH, Ho WT, Greenberg DL, Davie EW. Transcriptional regulation of the gene coding for human protein C. *J Biol Chem* 1996; **271**: 9587-94.
340. Tsay W, Lee YM, Lee SC, Shen MC, Chen PJ. Characterization of human protein C gene promoter: insights from natural human mutants. *DNA Cell Biol* 1996; **15**: 907-19.
341. Shamsheer MK, Chuzhanova NA, Friedman B, Scopes DA, Alhaq A, Millar DS, Cooper DN, Berg LP. Identification of an intronic regulatory element in the human protein C (PROC) gene. *Hum Genet* 2000; **107**: 458-65.
342. Stenflo J, Fernlund P. Amino acid sequence of the heavy chain of bovine protein C. *J Biol Chem* 1982; **257**: 12180-90.
343. Stenflo J, Dahlbäck B. Vitamin K-dependent proteins in blood coagulation. In: Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H, eds. *The molecular Basis of Blood Diseases* (3rd ed). Philadelphia: W. B. Saunders Co.; 2001:579-613.
344. Foster D, Davie EW. Characterization of a cDNA coding for human protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; **81**: 4766-70.
345. Gerlitz B, Grinnell BW. Mutation of protease domain residues Lys37-39 in human protein C inhibits activation by the thrombomodulin-thrombin complex without affecting activation by free thrombin. *J Biol Chem* 1996; **271**: 22285-8.
346. Knobe KE, Berntsdotter A, Shen L, Morser J, Dahlbäck B, Villoutreix BO. Probing the activation of protein C by the thrombin-thrombomodulin complex using structural analysis, site-directed mutagenesis, and computer modeling. *Proteins* 1999; **35**: 218-34.
347. Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, Pagila R, Rumennik G, Seto M, Morser J, Light DR, Bode W. Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* 2000; **404**: 518-25.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

348. Dahlbäck B, Stenflo J. The protein C anticoagulant system. In: Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H, eds. *The molecular Basis of Blood Diseases* (3rd ed). Philadelphia: W. B. Saunders Co.; 2001:614-56.
349. Friedrich U, Blom AM, Dahlbäck B, Villoutreix BO. Structural and energetic characteristics of the heparin-binding site in antithrombotic protein C. *J Biol Chem* 2001; **276**: 24122-8.
350. Santamaria A, Roncuzzi L, Sbarra D, Cortese R, Romeo G. Isolation and sequence of a cDNA coding for human protein C. *New Trends in Experimental Haematology Sero Symposium*. Rome: Istituto Superiore di Sanita; 1985:296-97.
351. Romeo G, Hassan HJ, Staempfli S, Roncuzzi L, Cianetti L, Leonardi A, Vicente V, Mannucci PM, Bertina RM, Peschle C, et al. Hereditary thrombophilia: identification of nonsense and missense mutations in the protein C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**: 2829-32.
352. Bertina RM, Broekmans AW, Krommenhoek-van Es C, van Wijngaarden A. The use of a functional and immunologic assay for plasma protein C in the study of the heterogeneity of congenital protein C deficiency. *Thromb Haemost* 1984; **51**: 1-5.
353. Marlar RA, Montgomery RR, Broekmans AW. Diagnosis and treatment of homozygous protein C deficiency. Report of the Working Party on Homozygous Protein C Deficiency of the Subcommittee on Protein C and Protein S, International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *J Pediatr* 1989; **114**: 528-34.
354. Tuddenham EG, Takase T, Thomas AE, Awidi AS, Madanat FF, Abu Hajir MM, Kernoff PB, Hoffbrand AV. Homozygous protein C deficiency with delayed onset of symptoms at 7 to 10 months. *Thromb Res* 1989; **53**: 475-84.
355. Tripodi A, Franchi F, Krachmalnicoff A, Mannucci PM. Asymptomatic homozygous protein C deficiency. *Acta Haematol* 1990; **83**: 152-5.
356. Reitsma PH, Poort SR, Bernardi F, Gandrille S, Long GL, Sala N, Cooper DN. Protein C deficiency: a database of mutations. For the Protein C & S Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1993; **69**: 77-84.
357. Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, Gandrille S, Greengard JS, Ireland H, Krawczak M, Lind B, Long GL, Poort SR, et al. Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. On behalf of the Subcommittee on Plasma Coagulation Inhibitors of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; **73**: 876-89.
358. Frezzato M, Tosetto A, Rodeghiero F. Validated questionnaire for the identification of previous personal or familial venous thromboembolism. *Am J Epidemiol* 1996; **143**: 1257-65.

359. España F. Complexes of activated protein C with its inhibitors. In: Aznar J, España F, eds. *Protein C pathway*. Barcelona: Springer-Verlag; 1991:61-75.
360. España F, Berrettini M, Griffin JH. Purification and characterization of plasma protein C inhibitor. *Thromb Res* 1989; **55**: 369-84.
361. España F, Griffin JH. Determination of functional and antigenic protein C inhibitor and its complexes with activated protein C in plasma by ELISA's. *Thromb Res* 1989; **55**: 671-82.
362. Hendl S, España F, Aznar J, Estellés A, Gilabert J, Griffin JH. Immunoaffinity purification of protein C with a calcium-dependent monoclonal antibody. *Rev Iberoamer Tromb Haemost* 1991; **4**: 25-28.
363. España F, Estellés A, Aznar J, Gilabert J. Assay of protein C in human plasma: comparison of amidolytic, coagulation, and immunochemical assays. *Thromb Res* 1986; **44**: 771-82.
364. Avrameas S, Ternynck T. Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry* 1971; **8**: 1175-9.
365. España F, Zuazu I, Vicente V, Estellés A, Marco P, Aznar J. Quantification of circulating activated protein C in human plasma by immunoassays--enzyme levels are proportional to total protein C levels. *Thromb Haemost* 1996; **75**: 56-61.
366. España F, Vayá A, Mira Y, Medina P, Estellés A, Villa P, Falcó C, Aznar J. Low level of circulating activated protein C is a risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 1368-73.
367. Hendl S, España F, Aznar J, Estellés A, Gilabert J. Functional and immunological determination of protein C by immunosorbent assays. *Rev Iberoamer Tromb Haemost* 1991; **4**: 16-20.
368. España F, Hendl S, Gilabert J, Estellés A, Aznar J. Evaluation of two functional assays for protein C inhibitor/plasminogen activator inhibitor-3 activity. *Thromb Res* 1993; **70**: 375-84.
369. Jorquera JI, Montoro JM, Fernández MA, Aznar JA, Aznar J. Modified test for activated protein C resistance. *Lancet* 1994; **344**: 1162-3.
370. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 1215.
371. Izquierdo M. Técnicas bioquímicas básicas para el análisis genético a nivel molecular. *Ingeniería Genética*. Madrid: Ediciones Pirámide S.A.; 1993:71-72.
372. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; **230**: 1350-4.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

373. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; **51 Pt 1**: 263-73.
374. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; **155**: 335-50.
375. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; **239**: 487-91.
376. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 1976; **127**: 1550-7.
377. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Vol. 2 (second ed): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989:14.5-14.34.
378. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 3389-402.
379. Schaffer AA, Aravind L, Madden TL, Shavirin S, Spouge JL, Wolf YI, Koonin EV, Altschul SF. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: 2994-3005.
380. Shirai T, Shiojiri S, Ito H, Yamamoto S, Kusumoto H, Deyashiki Y, Maruyama I, Suzuki K. Gene structure of human thrombomodulin, a cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biochem (Tokyo)* 1988; **103**: 281-5.
381. Foster DC, Yoshitake S, Davie EW. The nucleotide sequence of the gene for human protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**: 4673-7.
382. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Vol. 1 (second ed): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989:6.3-6.60.
383. Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 1981; **214**: 1205-10.
384. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. DNA Sequencing. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Vol. 2 (second ed): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989:13.3-13.102.
385. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986; **321**: 674-9.
386. Gough JA, Murray NE. Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J Mol Biol* 1983; **166**: 1-19.

387. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**: 9436-40.
388. Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 615-9.
389. Hamaguchi K, Geiduschek EP. The effect of electrolytes on the stability of deoxyribonucleate helix. *J. Am. Chem. Soc* 1962; **84**: 1329-37.
390. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Quantitation of DNA and RNA. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Vol. 3 (second ed): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989:E.5-E.6.
391. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 2766-70.
392. Sekiya T. Technologies for detection of DNA Damage and Mutations, chapter 21: Plenum Press, New York; 1996:281-90.
393. Hayashi K. Laboratory Protocols for Mutation Detection: Oxford University Press; 1996:14-22.
394. Spinardi L, Mazars R, Theillet C. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 4009.
395. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Preparation of reagents and buffers used in molecular cloning. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Vol. 3 (second ed): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989:B.20-B.26.
396. Cotton RG. Current methods of mutation detection. *Mutat Res* 1993; **285**: 125-44.
397. Glavac D, Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat* 1993; **2**: 404-14.
398. Prosser J. Detecting single-base mutations. *Trends Biotechnol* 1993; **11**: 238-46.
399. Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet* 1993; **5**: 111-7.
400. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Standard markers for gel electrophoresis. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Vol. 3 (second ed): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989:E.20.
401. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Enzymes used in molecular cloning. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Vol. 1 (second ed): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989:5.3-5.33.



## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

402. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: 308-11.
403. Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. NCBI Reference Sequence project: update and current status. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 34-7.
404. Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 1995; **23**: 4878-84.
405. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955; **19**: 251-3.
406. Suzuki K, Nishioka J, Hashimoto S. Protein C inhibitor. Purification from human plasma and characterization. *J Biol Chem* 1983; **258**: 163-8.
407. Heeb MJ, Griffin JH. Physiologic inhibition of human activated protein C by alpha 1-antitrypsin. *J Biol Chem* 1988; **263**: 11613-6.
408. Cattaneo M, Franchi F, Zighetti ML, Martinelli I, Asti D, Mannucci PM. Plasma levels of activated protein C in healthy subjects and patients with previous venous thromboembolism: relationships with plasma homocysteine levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**: 1371-5.
409. Franchi F, Biguzzi E, Cetin I, Facchetti F, Radaelli T, Bozzo M, Pardi G, Faioni EM. Mutations in the thrombomodulin and endothelial protein C receptor genes in women with late fetal loss. *Br J Haematol* 2001; **114**: 641-6.
410. Biguzzi E, Gu JM, Merati G, Esmon NL, Esmon CT. Point mutations in the endothelial protein C receptor (EPCR) promoter. *Thromb Haemost* 2002; **87**: 1085-6.
411. Saposnik B, Reny JL, Gaussem 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.
412. Uitte de Willige S, Van Marion V, Rosendaal FR, Vos HL, de Visser MC, Bertina RM. Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2004; **2**: 1305-10.
413. Merati G, Biguzzi E, Oganessian N, Fétiqueau R, Qu D, Bucciarelli P, Stearns-Kurosawa DJ, Mannucci PM, Esmon CT, Faioni EM. A 23bp insertion in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene in patients with myocardial infarction and deep vein thrombosis. *Supplement to the journal Thromb Haemost* 1999: 507.
414. Hermida J, Hurtado V, Villegas-Méndez A, Catto AJ, Philippou H. Identification and characterization of a natural R96C EPCR variant. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 1850-2.

415. Medina P, España F, Villa P, Vayá A, Mira Y, Estellés A, Royo M, Bertina RM, Aznar J. The C1418T polymorphism in the thrombomodulin gene is associated with increased levels of circulating activated protein C. *Supplement to the journal Thromb Haemost* 2001
416. Le Flem L, Mennen L, Aubry ML, Aiach M, Scarabin PY, Emmerich J, Alhenc-Gelas M. Thrombomodulin promoter mutations, venous thrombosis, and varicose veins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**: 445-51.
417. Öhlin AK, Holm J, Hillarp A. Genetic variation in the human thrombomodulin promoter locus and prognosis after acute coronary syndrome. *Thromb Res* 2004; **113**: 319-26.
418. Kunz G, Ireland HA, Stubbs PJ, Kahan M, Coulton GC, Lane DA. Identification and characterization of a thrombomodulin gene mutation coding for an elongated protein with reduced expression in a kindred with myocardial infarction. *Blood* 2000; **95**: 569-76.
419. Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Hidari N, Esmon CT. Identification of functional endothelial protein C receptor in human plasma. *J Clin Invest* 1997; **100**: 411-8.
420. Stearns-Kurosawa DJ, Swindle K, D'Angelo A, Della Valle P, Fattorini A, Caron N, Grimaux M, Woodhams B, Kurosawa S. Plasma levels of endothelial protein C receptor respond to anticoagulant treatment. *Blood* 2002; **99**: 526-30.
421. España F, Medina P, Mira Y, Estellés A, Vayá A, Villa P, Royo M, Aznar J, Bertina RM. A new polymorphism in the 3'UTR region of the endothelial protein C receptor is associated with increased levels of circulating activated protein C and decreased risk of venous thrombosis. *Supplement to the journal Thromb Haemost* 2001
422. Dahlbäck B. Inherited resistance to activated protein C, a major basis of venous thrombosis, is caused by deficient anticoagulant cofactor function of factor V. *Haematologica* 1995; **80 Suppl 2**: 102-13.
423. De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K, Leone G. Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. *Haematologica* 2002; **87**: 1095-108.
424. Seligsohn U, Zivelin A. Thrombophilia as a multigenic disorder. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 297-301.
425. Makris M, Preston FE, Beauchamp NJ, Cooper PC, Daly ME, Hampton KK, Bayliss P, Peake IR, Miller GJ. Co-inheritance of the 20210A allele of the prothrombin gene increases the risk of thrombosis in subjects with familial thrombophilia. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 1426-9.
426. Zöller B, Berntsdotter A, Garcia de Frutos P, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood* 1995; **85**: 3518-23.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

427. Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Woodhams B, Mira Y, Villa P, Migaud-Fressart M, Ferrando F, Aznar J, Bertina RM, España F. 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.
428. Snow TR, Deal MT, Dickey DT, Esmon CT. Protein C activation following coronary artery occlusion in the in situ porcine heart. *Circulation* 1991; **84**: 293-9.
429. Sheth SB, Carvalho AC. Protein S and C alterations in acutely ill patients. *Am J Hematol* 1991; **36**: 14-9.
430. Esmon CT. The protein C anticoagulant pathway. *Arterioscler Thromb* 1992; **12**: 135-45.
431. Gruber A, Pal A, Kiss RG, Sas G, Griffin JH. Generation of activated protein C during thrombolysis. *Lancet* 1993; **342**: 1275-6.
432. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; **342**: 1503-6.
433. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; **82**: 1989-93.
434. Svensson PJ, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; **330**: 517-22.
435. Gruber A, Griffin JH. Direct detection of activated protein C in blood from human subjects. *Blood* 1992; **79**: 2340-8.
436. Orthner CL, Kolen B, Drohan WN. A sensitive and facile assay for the measurement of activated protein C activity levels in vivo. *Thromb Haemost* 1993; **69**: 441-7.
437. España F, Zuazu I, Vicente V, Estellés A, Marco P, Aznar J. Quantification of circulating activated protein C in human plasma by immunoassays--enzyme levels are proportional to total protein C levels. *Thromb Haemost* 1996; **75**: 56-61.
438. Ohlin AK, Marlar RA. The first mutation identified in the thrombomodulin gene in a 45-year-old man presenting with thromboembolic disease. *Blood* 1995; **85**: 330-6.
439. Ohlin AK, Marlar RA. Thrombomodulin gene defects in families with thromboembolic disease--a report on four families. *Thromb Haemost* 1999; **81**: 338-44.
440. Faioni EM, Franchi F, Asti D, Mannucci PM. Activation of the protein C pathway in hereditary thrombophilia. *Thromb Haemost* 1998; **80**: 557-60.

441. von Depka M, Czwalińska A, Eisert R, Wermes C, Scharrer I, Ganser A, Ehrenforth S. Prevalence of a 23bp insertion in exon 3 of the endothelial cell protein C receptor gene in venous thrombophilia. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 1360-2.
442. Akar N, Gokdemir R, Ozel D, Akar E. Endothelial cell protein C receptor (EPCR) gene exon III, 23 bp insertion mutation in the Turkish pediatric thrombotic patients. *Thromb Haemost* 2002; **88**: 1068-9.
443. Galligan L, Livingstone W, Mynett-Johnston L, Smith OP. Prevalence of the 23bp endothelial protein C receptor (EPCR) gene insertion in the Irish population. *Thromb Haemost* 2002; **87**: 773-4.
444. Grossmann R, Geisen U, Merati G, Mullges W, Schambeck CM, Walter U, Schwender S. Genetic risk factors in young adults with 'cryptogenic' ischemic cerebrovascular disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; **13**: 583-90.
445. Grossmann R, Schwender S, Geisen U, Schambeck C, Merati G, Walter U. CBS 844ins68, MTHFR TT677 and EPCR 4031ins23 genotypes in patients with deep-vein thrombosis. *Thromb Res* 2002; **107**: 13-5.
446. Poort SR, Vos HL, Rosendaal FR, Bertina RM. The endothelial protein C receptor (EPCR) 23 bp insert mutation and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2002; **88**: 160-2.
447. Zecchina G, Bosio S, Brusa E, Rege-Cambrin G, Camaschella C. Epcr 23 bp insertion in a patient with severe progressive arterial disease: a dominant loss of function mutant in conditions of increased APC request? *Br J Haematol* 2002; **119**: 881-2.
448. French JK, Van de Water NS, Sutton TM, Lund M, Gao W, McDowell J, Liu-Stratton Y, Pohorence J, Szymanski D, Goldschmidt-Clermont P, White HD, Browett PJ, Cooke G. Potential thrombophilic mutations/polymorphisms in patients with no flow-limiting stenosis after myocardial infarction. *Am Heart J* 2003; **145**: 118-24.
449. Biguzzi E, Merati G, Liaw PC, Bucciarelli P, Oganessian N, Qu D, Gu JM, Fétique R, Esmon CT, Mannucci PM, Faioni EM. A 23bp insertion in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene impairs EPCR function. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 945-8.
450. Van de Water NS, French JK, McDowell J, Browett PJ. The endothelial protein C receptor (EPCR) 23bp insert in patients with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 749-51.
451. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; **346**: 1133-4.
452. Van de Water N, Williams R, Dare A, Abbott W, Browett P. The prevalence of factor V Leiden (Gln506) in Polynesians. *Thromb Haemost* 1997; **78**: 962-3.

## Mutaciones en el Sistema de la proteína C

---

453. Galligan L, Powell C, Livingstone W, Mynett-Johnston L, Smith OP. The G7763C endothelial protein C receptor (EPCR) gene mutation: prevalence and association with DVT in the Irish population. *Thromb Haemost* 2002; **88**: 163-5.
454. Hurtado V, Montes R, Gris JC, Bertolaccini ML, Alonso A, Martínez-González MA, Khamashta MA, Fukudome K, Lane DA, Hermida J. Autoantibodies against EPCR are found in antiphospholipid syndrome and are a risk factor for fetal death. *Blood* 2004; **104**: 1369-74.
455. Faioni EM, Franchi F, Castaman G, Biguzzi E, Rodeghiero F. Mutations in the thrombomodulin gene are rare in patients with severe thrombophilia. *Br J Haematol* 2002; **118**: 595-9.
456. Konstantoulas C, Hawe E, Saut N, Yudkin JS, di Minno G, Margaglione M, Hamsten A, Humphries SE, Juhan-Vague I, Ireland H. Common variants in the thrombomodulin gene as a risk for myocardial infarction in the north of Europe (HIFMECH Study). *Thromb Haemost* 2004; **91**: 628-30.
457. Zivelin A, Rosenberg N, Faier S, Kornbrot N, Peretz H, Mannhalter C, Horellou MH, Seligsohn U. A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Blood* 1998; **92**: 1119-24.
458. Pérez-Ceballos E, Corral J, Alberca I, Vayá A, Llamas P, Montes R, González-Conejero R, Vicente V. Prothrombin A19911G and G20210A polymorphisms' role in thrombosis. *Br J Haematol* 2002; **118**: 610-4.
459. Soria JM, Almasy L, Souto JC, Tirado I, Borell M, Mateo J, Slifer S, Stone W, Blangero J, Fontcuberta J. Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. *Blood* 2000; **95**: 2780-5.
460. von Ahsen N, Oellerich M. The intronic prothrombin 19911A>G polymorphism influences splicing efficiency and modulates effects of the 20210G>A polymorphism on mRNA amount and expression in a stable reporter gene assay system. *Blood* 2004; **103**: 586-93.
461. Poort SR, Njo KT, Vos HL, Bertina RM. Two novel mutations in the prothrombin gene cause severe bleeding in a compound heterozygous patient. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; **9**: 761-4.
462. Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 1992; **90**: 41-54.
463. Spek CA, Koster T, Rosendaal FR, Bertina RM, Reitsma PH. Genotypic variation in the promoter region of the protein C gene is associated with plasma protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; **15**: 214-8.
464. Ireland H, Thompson E, Lane DA. Gene mutations in 21 unrelated cases of phenotypic heterozygous protein C deficiency and thrombosis. Protein C Study Group. *Thromb Haemost* 1996; **76**: 867-73.

465. Zhang L, Castellino FJ. The binding energy of human coagulation protein C to acidic phospholipid vesicles contains a major contribution from leucine 5 in the gamma-carboxyglutamic acid domain. *J Biol Chem* 1994; **269**: 3590-5.
466. Gaussem P, Gandrille S, Duchemin J, Emmerich J, Alhenc-Gelas M, Aillaud MF, Aiach M. Influence of six mutations of the protein C gene on the Gla domain conformation and calcium affinity. *Thromb Haemost* 1994; **71**: 748-54.
467. Faioni EM, Hermida J, Rovida E, Razzari C, Asti D, Zeinali S, Mannucci PM. Type II protein C deficiency: identification and molecular modelling of two natural mutants with low anticoagulant and normal amidolytic activity. *Br J Haematol* 2000; **108**: 265-71.
468. Mimuro J, Muramatsu S, Kaneko M, Yoshitake S, Iijima K, Nakamura K, Sakata Y, Matsuda M. An abnormal protein C (protein C Yonago) with an amino acid substitution of Gly for Arg-15 caused by a single base mutation of C to G in codon 57 (CGG-->GGG). Deteriorated calcium-dependent conformation of the gamma-carboxyglutamic acid domain relevant to a thrombotic tendency. *Int J Hematol* 1993; **57**: 9-14.
469. Millar DS, Grundy CB, Bignell P, Moffat EH, Martin R, Kakkar VV, Cooper DN. A Gla domain mutation (Arg 15-->Trp) in the protein C (PROC) gene causing type 2 protein C deficiency and recurrent venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; **4**: 345-7.
470. Lind B, Schwartz M, Thorsen S. Six different point mutations in seven Danish families with symptomatic protein C deficiency. *Thromb Haemost* 1995; **73**: 186-93.
471. Steinkamp M, Geva A, Joffe S, Lapp CN, Neufeld EJ. Chronic disseminated intravascular coagulation and childhood-onset skin necrosis resulting from homozygosity for a protein C Gla domain mutation, Arg15Trp. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002; **24**: 685-8.
472. Bovill EG, Tomczak JA, Grant B, Bhushan F, Pillemer E, Rainville IR, Long GL. Protein C Vermont: symptomatic type II protein C deficiency associated with two GLA domain mutations. *Blood* 1992; **79**: 1456-65.
473. Lu D, Bovill EG, Long GL. Molecular mechanism for familial protein C deficiency and thrombosis in protein C Vermont (Glu20-->Ala and Val34-->Met). *J Biol Chem* 1994; **269**: 29032-8.
474. Ido M, Ohiwa M, Hayashi T, Nishioka J, Hatada T, Watanabe Y, Wada H, Shirakawa S, Suzuki K. A compound heterozygous protein C deficiency with a single nucleotide G deletion encoding Gly-381 and an amino acid substitution of Lys for Gla-26. *Thromb Haemost* 1993; **70**: 636-41.
475. Zhang L, Castellino FJ. A gamma-carboxyglutamic acid (gamma) variant (gamma 6D, gamma 7D) of human activated protein C displays greatly reduced activity as an anticoagulant. *Biochemistry* 1990; **29**: 10828-34.

476. Zhang L, Jhingan A, Castellino FJ. Role of individual gamma-carboxyglutamic acid residues of activated human protein C in defining its in vitro anticoagulant activity. *Blood* 1992; **80**: 942-52.
477. Zhang L, Castellino FJ. Influence of specific gamma-carboxyglutamic acid residues on the integrity of the calcium-dependent conformation of human protein C. *J Biol Chem* 1992; **267**: 26078-84.
478. Zhang L, Castellino FJ. The contributions of individual gamma-carboxyglutamic acid residues in the calcium-dependent binding of recombinant human protein C to acidic phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 1993; **268**: 12040-5.
479. Jhingan A, Zhang L, Christiansen WT, Castellino FJ. The activities of recombinant gamma-carboxyglutamic-acid-deficient mutants of activated human protein C toward human coagulation factor Va and factor VIII in purified systems and in plasma. *Biochemistry* 1994; **33**: 1869-75.
480. Preston RJ, Villegas-Méndez A, Sun YH, Hermida J, Simioni P, Philippou H, Dahlbäck B, Lane DA. Selective modulation of protein C affinity for EPCR and phospholipids by Gla domain mutation. *Febs J* 2005; **272**: 97-108.
481. Conrad M, Friedlander C, Goodman M. Evidence that natural selection acts on silent mutation. *Biosystems* 1983; **16**: 101-11.
482. Padgett RA, Grabowski PJ, Konarska MM, Seiler S, Sharp PA. Splicing of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem* 1986; **55**: 1119-50.
483. Green MR. Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. *Annu Rev Cell Biol* 1991; **7**: 559-99.
484. Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 1987; **15**: 7155-74.
485. Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 2003; **17**: 419-37.
486. McCullough AJ, Berget SM. G triplets located throughout a class of small vertebrate introns enforce intron borders and regulate splice site selection. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 4562-71.
487. Majewski J, Ott J. Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Res* 2002; **12**: 1827-36.
488. Lim LP, Burge CB. A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 11193-8.
489. Reitsma PH, Poort SR, Allaart CF, Briët E, Bertina RM. The spectrum of genetic defects in a panel of 40 Dutch families with symptomatic protein C deficiency type I: heterogeneity and founder effects. *Blood* 1991; **78**: 890-4.

490. Soria JM, Fontcuberta J, Borrell M, Estivill X, Sala N. Protein C deficiency: identification of a novel two-base pair insertion and two point mutations in exon 7 of the protein C gene in Spanish families. *Hum Mutat* 1992; **1**: 428-31.
491. Soria JM, Fontcuberta J, Chillon M, Borrell M, Estivill X, Sala N. Acceptor splice site mutation in the invariant AG of intron 5 of the protein C gene, causing type I protein C deficiency. *Hum Genet* 1993; **92**: 506-8.
492. Lind B, van Solinge WW, Schwartz M, Thorsen S. Splice site mutation in the human protein C gene associated with venous thrombosis: demonstration of exon skipping by ectopic transcript analysis. *Blood* 1993; **82**: 2423-32.
493. Miyata T, Sakata T, Zheng YZ, Tsukamoto H, Umeyama H, Uchiyama S, Ikusaka M, Yoshioka A, Imanaka Y, Fujimura H, Kambayashi J, Kato H. Genetic characterization of protein C deficiency in Japanese subjects using a rapid and nonradioactive method for single-stand conformational polymorphism analysis and a model building. *Thromb Haemost* 1996; **76**: 302-11.
494. Millar DS, Johansen B, Berntorp E, Minford A, Bolton-Maggs P, Wensley R, Kakkar V, Schulman S, Torres A, Bosch N, Cooper DN. Molecular genetic analysis of severe protein C deficiency. *Hum Genet* 2000; **106**: 646-53.
495. Nestic D, Cheng J, Maquat LE. Sequences within the last intron function in RNA 3'-end formation in cultured cells. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 3359-69.
496. Colgan DF, Manley JL. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 1997; **11**: 2755-66.
497. Keller W, Minvielle-Sebastia L. A comparison of mammalian and yeast pre-mRNA 3'-end processing. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 329-36.
498. McLauchlan J, Gaffney D, Whitton JL, Clements JB. The consensus sequence YGTGTTY located downstream from the AATAAA signal is required for efficient formation of mRNA 3' termini. *Nucleic Acids Res* 1985; **13**: 1347-68.
499. Beyer K, Dandekar T, Keller W. RNA ligands selected by cleavage stimulation factor contain distinct sequence motifs that function as downstream elements in 3'-end processing of pre-mRNA. *J Biol Chem* 1997; **272**: 26769-79.
500. Birnstiel ML, Busslinger M, Strub K. Transcription termination and 3' processing: the end is in site! *Cell* 1985; **41**: 349-59.
501. Moore CL, Skolnik-David H, Sharp PA. Analysis of RNA cleavage at the adenovirus-2 L3 polyadenylation site. *Embo J* 1986; **5**: 1929-38.
502. Sheets MD, Ogg SC, Wickens MP. Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 5799-805.
503. Chen F, MacDonald CC, Wilusz J. Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucleic Acids Res* 1995; **23**: 2614-20.



504. Danckwardt S, Gehring NH, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Pforsich M, Frede U, Hentze MW, Kulozik AE. The prothrombin 3'end formation signal reveals a unique architecture that is sensitive to thrombophilic gain-of-function mutations. *Blood* 2004; **104**: 428-35.
505. Takagaki Y, Manley JL. RNA recognition by the human polyadenylation factor CstF. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 3907-14.
506. Wylenzek M, Geisen C, Stapenhorst L, Wielckens K, Klingler KR. A novel point mutation in the 3' region of the prothrombin gene at position 20221 in a Lebanese/Syrian family. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 943-4.
507. Balim Z, Kosova B, Falzon K, Bezzina Wettinger S, Colak Y. Budd-Chiari syndrome in a patient heterozygous for the point mutation C20221T of the prothrombin gene. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 852-3.
508. Moreira A, Takagaki Y, Brackenridge S, Wollerton M, Manley JL, Proudfoot NJ. The upstream sequence element of the C2 complement poly(A) signal activates mRNA 3' end formation by two distinct mechanisms. *Genes Dev* 1998; **12**: 2522-34.
509. Brackenridge S, Proudfoot NJ. Recruitment of a basal polyadenylation factor by the upstream sequence element of the human lamin B2 polyadenylation signal. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 2660-9.
510. Natalizio BJ, Muniz LC, Arhin GK, Wilusz J, Lutz CS. Upstream elements present in the 3'-untranslated region of collagen genes influence the processing efficiency of overlapping polyadenylation signals. *J Biol Chem* 2002; **277**: 42733-40.
511. Zhao J, Hyman L, Moore C. Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; **63**: 405-45.
512. Kaufmann I, Martin G, Friedlein A, Langen H, Keller W. Human Fip1 is a subunit of CPSF that binds to U-rich RNA elements and stimulates poly(A) polymerase. *Embo J* 2004; **23**: 616-26.
513. Dye MJ, Proudfoot NJ. Terminal exon definition occurs cotranscriptionally and promotes termination of RNA polymerase II. *Mol Cell* 1999; **3**: 371-8.
514. Minvielle-Sebastia L, Keller W. mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Curr Opin Cell Biol* 1999; **11**: 352-7.
515. Proudfoot N. Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**: 290-3.
516. Navarro A, Frevel M, Gamero AM, Williams BR, Feldman G, Lerner AC. Thrombomodulin RNA is destabilized through its 3'-untranslated element in cells exposed to IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res* 2003; **23**: 723-8.

517. Morales J, Russell JE, Liebhaber SA. Destabilization of human alpha-globin mRNA by translation anti-termination is controlled during erythroid differentiation and is paralleled by phased shortening of the poly(A) tail. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6607-13.
518. Munroe D, Jacobson A. mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 3441-55.
519. Searfoss A, Dever TE, Wickner R. Linking the 3' poly(A) tail to the subunit joining step of translation initiation: relations of Pab1p, eukaryotic translation initiation factor 5b (Fun12p), and Ski2p-Slh1p. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 4900-8.
520. Wakiyama M, Honkura N, Miura KI. Interference with interaction between eukaryotic translation initiation factor 4G and poly(A)-binding protein in *Xenopus* oocytes leads to inhibition of polyadenylated mRNA translation and oocyte maturation. *J Biochem (Tokyo)* 2001; **130**: 737-40.
521. Zilka A, Garlapati S, Dahan E, Yaolsky V, Shapira M. Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 2001; **276**: 47922-9.
522. Higgs DR, Goodbourn SE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Proudfoot NJ. Alpha-thalassaemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature* 1983; **306**: 398-400.
523. Orkin SH, Cheng TC, Antonarakis SE, Kazazian HH, Jr. Thalassaemia due to a mutation in the cleavage-polyadenylation signal of the human beta-globin gene. *Embo J* 1985; **4**: 453-6.
524. Jankovic L, Efremov GD, Petkov G, Kattamis C, George E, Yang KG, Stoming TA, Huisman TH. Two novel polyadenylation mutations leading to beta(+)-thalassaemia. *Br J Haematol* 1990; **75**: 122-6.
525. Rund D, Dowling C, Najjar K, Rachmilewitz EA, Kazazian HH, Jr., Oppenheim A. Two mutations in the beta-globin polyadenylation signal reveal extended transcripts and new RNA polyadenylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 4324-8.
526. Harteveld CL, Losekoot M, Haak H, Heister GA, Giordano PC, Bernini LF. A novel polyadenylation signal mutation in the alpha 2-globin gene causing alpha thalassaemia. *Br J Haematol* 1994; **87**: 139-43.
527. van Solinge WW, Lind B, van Wijk R, Hart HC, Kraaijenhagen RJ. Clinical expression of a rare beta-globin gene mutation co-inherited with haemoglobin E-disease. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; **34**: 949-54.
528. Barth ML, Fensom A, Harris A. Prevalence of common mutations in the arylsulphatase A gene in metachromatic leukodystrophy patients diagnosed in Britain. *Hum Genet* 1993; **91**: 73-7.

529. Bell DA, Stephens EA, Castranio T, Umbach DM, Watson M, Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Duncan H, Strange RC. Polyadenylation polymorphism in the acetyltransferase 1 gene (NAT1) increases risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; **55**: 3537-42.
530. Kleiman FE, Manley JL. Functional interaction of BRCA1-associated BARD1 with polyadenylation factor CstF-50. *Science* 1999; **285**: 1576-9.
531. Bertina RM. Genetic approach to thrombophilia. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 92-103.
532. Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, Arruda V, Hillarp A, Reny JL. 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.
533. Stearns-Kurosawa DJ, Burgin C, Parker D, Comp P, Kurosawa S. Bimodal distribution of soluble endothelial protein C receptor levels in healthy populations. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 855-6.
534. Petäjä J, Hakala L, Rasi V, Griffin JH. Circulating activated protein C in subjects with heterozygous Gln506-factor V. *Haemostasis* 1998; **28**: 31-6.
535. Tazawa R, Yamamoto K, Suzuki K, Hirokawa K, Hirosawa S, Aoki N. Presence of functional cyclic AMP responsive element in the 3'-untranslated region of the human thrombomodulin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **200**: 1391-7.
536. Tebo JM, Datta S, Kishore R, Kolosov M, Major JA, Ohmori Y, Hamilton TA. Interleukin-1-mediated stabilization of mouse KC mRNA depends on sequences in both 5'- and 3'-untranslated regions. *J Biol Chem* 2000; **275**: 12987-93.
537. Zoller B, Garcia de Frutos P, Hillarp A, Dahlbäck B. Thrombophilia as a multigenic disease. *Haematologica* 1999; **84**: 59-70.
538. Aznar J, Vayá A, Estellés A, Mira Y, Seguí R, Villa P, Ferrando F, Falcó C, Corella D, España F. Risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A variant and factor V Leiden and their interaction with oral contraceptives. *Haematologica* 2000; **85**: 1271-6.
539. Tirado I, Mateo J, Soria JM, Oliver A, Borrell M, Coll I, Vallve C, Souto JC, Martinez-Sanchez E, Fontcuberta J. Contribution of prothrombin 20210A allele and factor V Leiden mutation to thrombosis risk in thrombophilic families with other hemostatic deficiencies. *Haematologica* 2001; **86**: 1200-8.
540. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; **353**: 1167-73.